

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
am Universitätsklinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München Vorstand:
Prof. Dr. rer. nat. Dr. Michael von Bergwelt-Baildon

**Untersuchungen zur In-vitro-Aktivität neuer p53-MDM2-Antagonisten
in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie**

Dissertation
zum Erwerb des medizinischen Doktorgrades
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Lisa-Maria Köhler
aus
Sigmaringen
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Marion Subklewe
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. Ursula Zimmer-Strobl Prof. Dr. med. Beatrice Bachmeier
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Barbara Beck
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	15.10.2020

Für meine Eltern.

Eidesstattliche Erklärung

Köhler, Lisa-Maria

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

**„Untersuchungen zur In-vitro-Aktivität neuer p53-MDM2-Antagonisten
in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie“**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 21.11.2020 Lisa-Maria Köhler

Ort/Datum/Unterschrift der Doktorandin

Vorwort

Welcher Medizinstudent träumt nicht davon, ein neues Medikament gegen Krebs zu finden, welches alle bisherigen Therapieoptionen in den Schatten stellt? Für mich war die Onkologie mit ihren Krankheitsbildern und ihren Forschungsfeldern zu dem Zeitpunkt, als ich mich auf die Suche nach einer Doktorarbeit machte, ein noch weitgehend unbekanntes Terrain.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Marion Subklewe lernte ich über eine Ausschreibung am schwarzen Brett kennen. Nach dem ersten Besuch der Arbeitsgruppe sagte ich zu. Was zu Beginn etwas unüberlegt und überstürzt schien, war der Beginn einer wertvollen Erfahrung, die ich nicht missen möchte. Ich erkannte die Vor- und Nachteile des experimentellen Arbeitens. Ich lernte, dass Forschung viel Durchhaltevermögen und Geduld braucht. Ich, eine Medizinstudentin, die es bis dahin gewohnt war, Fakten auswendig zu lernen, um am Ende zwischen fünf Auswahlmöglichkeiten zu entscheiden, musste erfahren, dass es nicht auf jede Frage eine Antwort gibt und es erforderlich ist, um die Ecke zu denken. Darüber hinaus begriff ich, dass für eine Doktorarbeit nicht nur das Thema entscheidend ist. Ich war während meiner Zeit im Labor stets gut betreut und umgeben von hilfsbereiten und kreativen Menschen, die mich anspornten.

Am Ende bleibt nicht nur der Respekt vor den Kolleginnen und Kollegen, die sich täglich um den Fortschritt in der Medizin bemühen, vor den langsamen Mühlen einer Universitätsklinik nicht zurückschrecken, und Lust haben, weiterhin ein Teil davon zu bleiben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Rolle von p53 in der akuten myeloischen Leukämie	2
1.1.1	Die akute myeloische Leukämie	2
1.1.2	Regulation der p53-Funktionen	4
1.1.3	Tumorgenese durch <i>TP53</i> -Mutationen	6
1.1.4	Degradation von p53 durch MDM2	7
1.2	Interaktion zwischen p53 und MDM2	9
1.2.1	Biochemische Analyse der Interaktion	9
1.2.2	Der Vorläufer Nutlin-3a	10
1.2.3	Entwicklung neuer MDM2-Antagonisten	12
1.3	Fragestellung	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Chemikalien, Antikörper und Kits	16
2.1.2	Hergestellte Medien, Lösungen und Puffer	19
2.1.3	Geräte und Software	20
2.1.4	Verbrauchsmaterial	21
2.1.5	Zelllinien	22
2.1.6	AML-Blasten	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Zellkultur	24
2.2.2	Lösen und Verdünnen der neuen MDM2-Antagonisten	25
2.2.3	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	25
2.2.4	FITC Annexin V/ Propidiumiodid-Färbung	26
2.2.5	Analyse der SubG ₁ -Population im Zellzyklus	28
2.2.6	Water-Soluble-Tetrazolium-1 (WST-1)-Test	29
2.2.7	Caspase-Glo 3/7-Test	30
2.2.8	Western Blot	31
2.2.9	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Validierung der Wirksamkeit von Nutlin-3a	35
3.1.1	Nutlin-3a inhibiert das Wachstum in p53-wt-Zellen	35
3.1.2	Nutlin-3a erhöht die SubG ₁ Population in p53-wt-Zellen	36
3.1.3	Nutlin-3a reduziert die metabolische Aktivität und Proliferation von OCI-AML-3- und MOLM-13-Zellen	38
		XI

3.1.4	Nutlin-3a induziert Apoptose und Nekrose in p53-wt-Zellen	39
3.1.5	Nutlin-3a ist eine geeignete Kontrollsubstanz für die Testung neuer MDM2-Antagonisten	40
3.2	Die Bestimmung der biologischen Aktivität neuer potentieller MDM2-Antagonisten	41
3.2.1	YH239-EE induziert Apoptose und Nekrose in den p53-wt-Zelllinien MOLM-13 und OCI-AML-3	41
3.2.2	YH239-EE erhöht die SubG ₁ -Zellpopulation in MOLM-13- und OCI-AML-3-Zellen	43
3.3	Detaillierte Analyse der biologischen Wirkung von YH239-EE	45
3.3.1	Induktion von Apoptose und Nekrose durch YH239-EE	45
3.3.2	Behandlung mit YH239-EE erhöht die SubG ₁ -Population in MOLM-13-Zellen nach 24 h	47
3.3.3	YH239-EE reduziert konzentrationsabhängig die metabolische Aktivität/Proliferation von MOLM-13-Zellen	48
3.3.4	YH239-EE aktiviert die Effektorcaspasen 3 und 7	49
3.3.5	Analyse weiterer potentieller MDM2-Antagonisten	51
3.4	Analyse der (-) und (+) Enantiomere von YH239-EE	51
3.4.1	Starke Induktion von Apoptose durch YH239-EE (+)	52
3.4.2	Der Zell-Metabolismus wird stärker durch YH239-EE (+) als durch YH239-EE (-) reduziert	53
3.4.3	YH239-EE (+) erhöht die Caspase 3/7-Aktivität	54
3.4.4	Überexpression von p21 durch YH239-EE (+)	54
3.5	Patienten-abhängige Induktion von Apoptose durch YH239-EE (+)	55
4	Zusammenfassung	59
5	Diskussion	60
5.1	YH239-EE (+)- Neuer Hoffnungsträger?	60
5.2	Neue Phänomene oder alte Fehler?	62
5.3	YH239-EE (+) – ein Antagonist für Kombinationstherapien?	63
5.4	MDM2/MDMX-Antagonisten	64
5.5	Ausblick	65
6	Abstract	66
7	Publikationen	66
7.1	Hauptpublikation	66
7.2	Weitere Publikationen	66

8	Anhang	67
8.1	Weitere Daten	67
8.2	Literaturverzeichnis	68
8.3	Abbildungsverzeichnis	77
8.4	Tabellenverzeichnis	78
8.5	Abkürzungen	79
8.6	Ethikvotum	82
8.7	Danksagungen	83

1 Einleitung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine klonale Neoplasie des hämatopoetischen Systems deren Entstehungsmechanismen nicht gänzlich verstanden sind (Hamlin, Milbrandt, Heintz, & Azizkhan, 1984). Die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten stellt daher einen Schwerpunkt in der Krebsforschung dar. Mit einem medianen Erkrankungsalter von 71 Jahren bei Männern und 73 Jahren bei Frauen ist die AML, nicht nur in Deutschland, vorwiegend eine Erkrankung des höheren Alters (Robert-Koch-Institut, 2017). Die Pathogenese ist multifaktoriell und führt zu einer Differenzierungsstörung der myeloischen Zellen. Neben genetischen und molekularen Aberrationen liegen in einigen Fällen auch Veränderungen von Onkogenen und Tumorsuppressoren wie p53 vor (Braess *et al.*, 2009). Mehr als die Hälfte aller soliden Tumoren tragen eine Mutation im *TP53*- Gen (Hollstein, Sidransky, Vogelstein, & Harris, 1991). Bei Patienten mit AML spielt die Mutation von *TP53* eine untergeordnete Rolle (Hu, Zhang, & Deisseroth, 1992). Allerdings kann es zu Fehlregulationen bzw. Inaktivierung der p53-Aktivität in Krebszellen kommen, weshalb Antagonisten von p53-Inhibitoren im Fokus neuer Behandlungsansätze der AML stehen (Prokocimer, Molchadsky, & Rotter, 2017).

Das derzeitige mehrstufige Therapieregime der AML sieht, je nach Protokoll, eine Kombination verschiedener Zytostatika vor. Die Remissionsraten für Patienten, vor allem ab einem Alter von 60 Jahren, sind jedoch enttäuschend und die Rezidivraten hoch (Braess *et al.*, 2009). Aussagen über die Mortalität der AML in Deutschland lassen sich nur schwer treffen, da es, anders als in den USA, kein zentrales Krebsregister gibt. Das Robert-Koch-Institut bündelt zwar die Register verschiedener Bundesländer, unterscheidet jedoch beispielsweise nicht zwischen einzelnen Subformen. Laut dem größten Krebsregister der USA (SEER) beträgt die aktuelle Mortalität der AML 2,8/100 000 und steigt mit zunehmendem Alter. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt laut SEER bei 28,3 % (Howlader N, 2019). Aufgrund dieser Tatsache sind alternative oder ergänzende Therapieoptionen dringend erforderlich. Einen interessanten Ansatzpunkt hierfür stellt die Interaktion zwischen p53 und dem Protoonkoprotein MDM2, einer Ubiquitin Ligase, dar, die in der AML häufig überexprimiert ist und den Abbau von p53 vermittelt (Bueso-Ramos, Yang, deLeon, McCown, Stass, & Albitar, 1993). Nach Hemmung der

Interaktion zwischen p53 und MDM2 bleiben die regulatorischen Funktionen von p53 in Zellzyklus und Apoptose erhalten (L. Chen, Agrawal, Zhou, Zhang, & Chen, 1998). Kojima *et al.* zeigten in ihrer Arbeit die Wirksamkeit des MDM2-Antagonisten Nutlin-3 in AML-Zelllinien und primären Blasten von AML-Patienten (Kojima *et al.*, 2005). Die zur Nutlin-Familie gehörende Verbindung RG7112 hat mittlerweile bereits erfolgreich eine klinische Phase-1-Studie durchlaufen (Andreeff *et al.*, 2016). Dennoch kamen bislang weder Substanzen aus der Gruppe der Nutlins, noch andere p53-MDM2-Antagonisten in der Behandlung der AML zur Anwendung. Gründe dafür sind eine schwache Pharmakokinetik und -dynamik, die eine hohe effektive Dosis erfordern und mit einer hohen generellen Toxizität sowie schweren Nebenwirkungen einhergehen (Beryozkina *et al.*, 2011).

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die biologische Wirksamkeit einer Gruppe neuer potentieller MDM2-Antagonisten zu untersuchen, die mittels Fragment-basiertem Design synthetisiert wurden und genau auf die Interaktionsstelle zwischen p53 und MDM2 zugeschnitten sind.

1.1 Die Rolle von p53 in der akuten myeloischen Leukämie

1.1.1 Die akute myeloische Leukämie

Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts steigt das bei Kindern und jungen Erwachsenen noch geringe Erkrankungsrisiko für eine Leukämie ab dem 30. Lebensjahr kontinuierlich, mit einer höheren Inzidenz bei Männern im Vergleich zu Frauen. Im Jahr 2014 erkrankten unter 100.000 Personen 13,8 Männer und 8,9 Frauen an Leukämie. Dabei lag bei 19 % der Männer und 21 % der Frauen eine AML vor. Somit ist die AML nach der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) die zweithäufigste Leukämieform in Deutschland (Robert-Koch-Institut, 2017). Weltweit liegt die Inzidenz für die AML bei ca. 4,6 pro 100.000 pro Jahr für Männer und 3,0 pro 100.000 pro Jahr für Frauen. Der Anteil der AML bei den unter 65-jährigen ist mit 1,9 noch gering im Vergleich zur Gruppe der über 65-jährigen mit einer Inzidenz von 18,6 (Longo, 2010). Als maligne Neoplasie blutbildender Zellen zeichnet sich die AML dadurch aus, dass funktionell unreife myeloische Zellen im Knochenmark autonom und diffus proliferieren und ins Blut ausgeschwemmt werden. Klinisch äußert sich die Erkrankung neben dem unspezifischen Symptom der Abgeschlagenheit, mit einer ausgeprägten Blutungsneigung sowie Symptomen

des Blutmangels und Zeichen einer Infektion. Dies resultiert aus der Verdrängung der Erythro-, Thrombo- und Leukopoese im Knochenmark (Braess *et al.*, 2009). Als Ursache wird eine Kombination von mindestens zwei genetischen Veränderungen angesehen, die in Folge die Hämatopoese stören. Bei 50 % der Patienten liegen Veränderungen des Karyotyps vor. Das mit 30 % am häufigsten mutierte Gen bei AML Patienten mit normalem Karyotyp ist das Phosphoprotein Nucleophosmin 1 (NPM1) (Falini *et al.*, 2005). NPM1 ist multifunktionell und unter anderem an Transportprozessen zwischen Zellkern und Zytoplasma beteiligt (Borer, Lehner, Eppenberger, & Nigg, 1989). Häufig findet sich eine Mutation im *NPM1*-Gen zusammen mit einer internen Tandemduplikation (ITD) der „Fms-Like Tyrosine kinase 3“ (FLT3) (Nakao *et al.*, 1996). Durch diese Mutation ist die Kinase konstitutiv aktiv und führt zu einer deregulierten Zellproliferation (Kiyoi *et al.*, 1998). Während die Mutation von *NPM1* mit einer guten Prognose assoziiert ist (Dohner *et al.*, 2005), ist die Expression von ITD-FLT3 mit einer schlechteren Überlebensrate verbunden (Kottaridis *et al.*, 2001). Zu darüber hinaus existierenden Risikofaktoren für die Entwicklung einer AML gehören neben ionisierender Strahlung und Zytostatika im Rahmen einer vorangegangenen Chemotherapie auch die Trisomie 21 oder Benzol. Eine Reihe weiterer Risikofaktoren, wie virale Infektionen oder der Lebensstil, werden diskutiert. Die „World Health Organisation“ (WHO) empfahl 2008 die Einteilung der AML anhand zytogenetischer Merkmale zusammen mit klinischen Kriterien und den Subtypen der bis dahin gültigen „French-American-British“ (FAB)-Klassifikation, die allein auf morphologischen Charakteristika beruht. Eine sichere Diagnose erfordert einen Blastenanteil von mindestens 20 % in Knochenmark oder Blut. Seit 2008 kann die Diagnose allerdings auch anhand bestimmter genetischer Veränderungen gestellt werden (Bennett *et al.*, 1976; Vardiman *et al.*, 2009). Die AML wird nach Therapieprotokollen verschiedener Studiengruppen behandelt und beginnt mit einer Induktionstherapie, in der die Zytostatika Cytarabin über 7 Tage, sowie Daunorubicin oder andere Anthrazykline über 3 Tage verabreicht werden (Burnett, Wetzler, & Lowenberg, 2011). Ziel der Induktion ist es, die Zahl der malignen Zellen auf 5 % im Knochenmark zu reduzieren. Anhand der „Minimal Residual Disease“ (MRD) lassen sich darüber hinaus Vorhersagen zu Rezidiv- und Überlebensrate treffen (X. Chen *et al.*, 2015). Die sich anschließende Postremissionstherapie soll die komplette Remission sichern sowie verbleibende

Tumorzellen abtöten und richtet sich nach dem Risikoprofil des Patienten. Dieses ist abhängig von zyto genetischen Aberrationen und der MRD nach Induktion. Je nach Profil besteht neben der hoch dosierten Verabreichung von Cytarabin die Möglichkeit einer allogenen Stammzelltransplantation. Die Rate kompletter Remissionen nach Induktion liegt zwar bei 45-65 %, die 5-Jahresüberlebensrate bei Patienten über 60 Jahren ist allerdings nicht höher als 10-15 % (Burnett *et al.*, 2011). Dies weist auf die dringende Notwendigkeit neuer Therapieoptionen hin, von denen auch die Patientengruppe der über 60-jährigen profitieren könnte (Krug, Buchner, Berdel, & Muller-Tidow, 2011).

1.1.2 Regulation der p53-Funktionen

p53 wurde ursprünglich in mit Simian-Virus 40 (SV40) transformierten Zellen als SV40 large T-Antigen assoziiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa entdeckt (Lane & Crawford, 1979). Im Verlauf der Tumorgenese trägt die Assoziation des SV40 T-Antigens mit p53 zur Stabilisierung beider Faktoren und zur Transformation der Zelle bei (Parada, Land, Weinberg, Wolf, & Rotter, 1984). Allerdings vermitteln nur mutierte Varianten von p53 neoplastische Transformationen (Finlay, Hinds, & Levine, 1989). Zahlreiche nachfolgende funktionelle Untersuchungen haben die Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor fest etabliert. Die Aktivierung von p53 erfolgt durch verschiedene Signalketten und molekulare Mechanismen (s. Abb. 1). Bei DNS-Schäden, wie Doppelstrangbrüchen durch ionisierende Strahlung, erfolgt die Stabilisierung von p53 durch Phosphorylierung oder Acetylierung bestimmter Aminosäuren. Hierzu gehören im Amino-terminalen Bereich die Phosphorylierung von Serin (Hu *et al.*) an den Positionen 15, 20, 33, 37 und von Threonin an Position 18 durch verschiedene Proteinkinasen wie der „Ataxia Telangiectasia Mutated“ (ATM)-Kinase (Neochoritis *et al.*), der verwandten „Ataxia Telangiectasia Related“ (ATR)-Kinase (Boatright & Salvesen), der DNS-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), sowie der Checkpoint Kinasen Chk 1 und 2 (Carr, 2000; Honda & Yasuda, 1999; Sakaguchi, Saito, Higashimoto, Roy, Anderson, & Appella, 2000; Schon, Friedler, Bycroft, Freund, & Fersht, 2002; Vogelstein, Lane, & Levine, 2000). Nach Phosphorylierung dissoziiert p53 von seinem Inhibitor MDM2, wird dadurch aktiviert und hemmt durch Arretierung des Zellzyklus das Wachstum und die Proliferation geschädigter und potentiell maligner Zellen. Im Zuge dieser

posttranslationalen Modifikationen werden auch Aminosäuren im Carboxy-Terminus von MDM2 phosphoryliert, die unphosphoryliert die Ubiquitinierung von p53 und dessen Abbau vermitteln (s. Kapitel 1.1.4). Damit führt die Phosphorylierung von MDM2 an kritischen Aminosäuren zu einer Stabilisierung von p53 (Kubbutat, Ludwig, Levine, & Vousden, 1999). Ebenso erhöht eine p300/CBP-abhängige Acetylierung der C-terminalen Lysine 320, 373 und 382 von p53 dessen spezifische Bindung an Promotoren von p53-Zielgenen und induziert somit die p53-abhängige Genexpression (Meek, 1999). Noxen wie UV-Strahlung oder Chemotherapeutika aktivieren ebenfalls p53, insbesondere durch ATR- und Casein Kinase 2-abhängige Phosphorylierung (Vogelstein *et al.*, 2000). Sumoylierung¹ von Lysin 386 stimuliert die Transkriptionsaktivität von p53 insbesondere nach UV-Schäden (Rodriguez, Desterro, Lain, Midgley, Lane, & Hay, 1999). Zu den zahlreichen weiteren Aktivatoren zählt das Protein p14^{ARF}, ein Tumorsuppressor, der MDM2 sequestriert und dadurch den MDM2-vermittelten Abbau von p53 unterdrückt (de Stanchina *et al.*, 1998).

In seiner Rolle als Transkriptionsfaktor bindet p53 innerhalb seiner C-terminalen Region an die DNS von Zielgenen und stimuliert die Transkription von Genen, die u.a. den Übertritt von der G₁- in die S-Phase regulieren oder die Apoptose induzieren (Levine, Momand, & Finlay, 1991). Dies steht in direktem Zusammenhang mit der Funktion von p53 als Tumorsuppressor. Abramowitz *et al.* identifizierten 1153 Gene, die potentiell durch p53 reguliert werden können (Abramowitz, Neuman, Perlman, & Ben-Yehuda, 2017). p53 stimuliert die Expression des „cyclin dependent kinase“ (CDK)-Inhibitors p21^{WAF1/CIP1}, wodurch der Zellzyklus sowohl am Übergang der G₁- in die S-Phase, als von der G₂- in die M-Phase arretiert wird (Vogelstein *et al.*, 2000). p53-abhängige Expression des Proteins Reprimo arretiert den Zellzyklus ebenfalls in der G₂-Phase (Chan, Hermeking, Lengauer, Kinzler, & Vogelstein, 1999; Ohki *et al.*, 2000). Das „Growth Arrest and DNA Damage“ (*GADD45*)-Gen codiert für einen Stresssensor und Regulator des G₁-Checkpoints und wird ebenfalls durch p53 aktiviert (Kastan *et al.*, 1992). Weiterhin wird die Regulation des DNS-Replikations-Initiierungskomplex durch p53 diskutiert (Levine *et al.*, 1991; Zhou & Prives, 2003). Neben seinen Funktionen in der Steuerung der Zellteilung induziert p53 die Apoptose geschädigter und/oder maligner Zellen, indem es die Expression proapoptotischer

¹ Posttranslationale Modifikation mit dem small ubiquitin-related modifier Protein (Flotho & Melchior, 2013; Kudo *et al.*, 1999).

Proteine wie Bax oder NOXA hochreguliert, die ihrerseits durch Stimulation der mitochondrialen Cytochrom-C Ausschüttung zur Apoptose beitragen. Bax gehört zur Bcl-2 Protein Familie und aktiviert direkt die Transkription von p53 (Hanahan & Weinberg, 2000; Reed, 1999). Über die Induktion von DNS-Reparaturgenen (Wahl, Linke, Paulson, & Huang, 1997) und Genen der Antiangiogenese (el-Deiry, 1998) besitzt p53 zwei weitere Zielgruppen, die die Rolle von p53 als Tumorsuppressor unterstreichen.

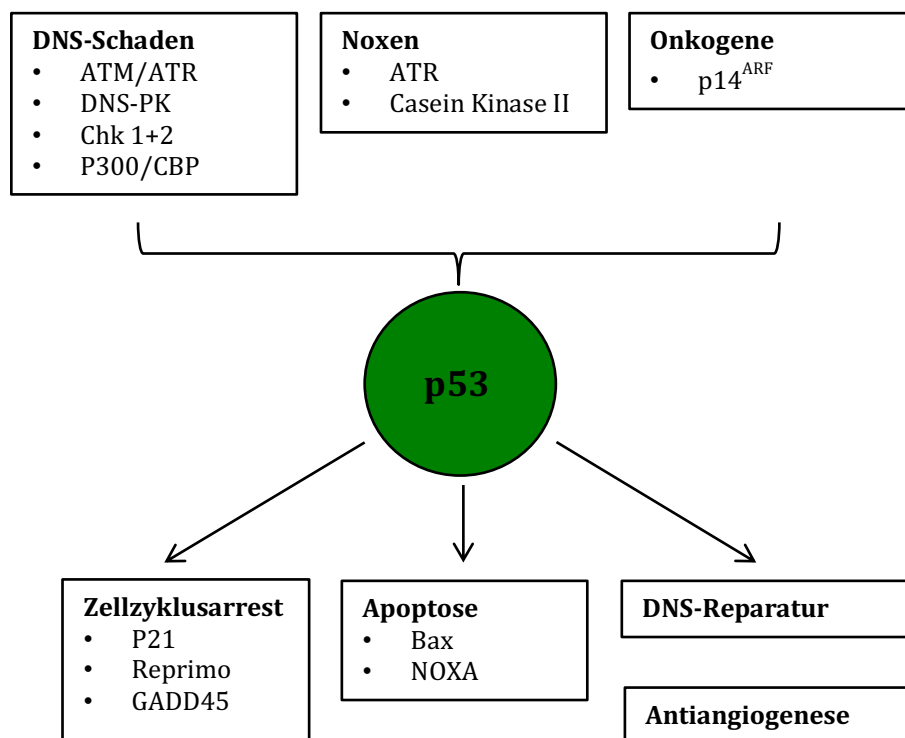


Abbildung 1: Aktivierung von p53.

Das Schema zeigt die häufigsten Ursachen, die einen Abbau von p53 verhindern, sowie die wichtigsten Funktionen von p53 als Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor mit den jeweiligen Mediatoren.

1.1.3 Tumorigenese durch *TP53*-Mutationen

In Anbetracht seiner Rolle als Tumorsuppressor stellt der Funktionsverlust von p53 einen wichtigen Schritt in der Tumorigenese dar. Mutationen des *TP53*-Gens gehören zu den am häufigsten mit Krebs assoziierten genetischen Veränderungen und können sowohl durch endogene, als auch durch exogene Faktoren ausgelöst werden (Hollstein *et al.*, 1991; Vogelstein, 1990). Unter AML-Patienten tragen 5 % eine Mutation auf dem *TP53*-Locus (Hu *et al.*, 1992). Aus der Mutationsanalyse können Rückschlüsse auf die biologische Aktivität und die Interaktion mit anderen

Proteinen geschlossen werden. Das humane Gen liegt auf Chromosom 17p (Levine *et al.*, 1991). Bei den in Leukämien relevanten Mutationen handelt es sich meist um Basensubstitutionen in einer 200 bp langen codierenden Region innerhalb der Exons 5-8. In dieser Region liegen kritische Aminosäuren, die für die Aktivität von p53 erforderlich sind. Bei einem Drittel der Mutationen handelt es sich um Transitionen an CpG-Dinukleotiden (Hollstein *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 1991). Das mutierte *TP53*-Allel verhält sich gegenüber dem Wildtyp (wt)-Allel rezessiv, sodass eine Tumorgenese erst eintritt, wenn zusätzlich das wt-Allel inaktiviert ist (Levine *et al.*, 1991). Aus diesem Grund sind Mutationen von *TP53* auch häufig mit einer 17p-Monosomie assoziiert (Fenaux *et al.*, 1991). Experimente mit kultivierten Zelllinien zeigten, dass das Verhältnis der Expression von mutiertem und wt-Allel eine wichtige Rolle spielt. Eine hohe Expression an mutiertem *TP53* führt dazu, dass die Mutante einen oligomeren Komplex mit wt-p53 bildet, was die Funktion von p53 komprimiert und die Tumorentstehung begünstigt. Ein Funktionsverlust von p53 bedeutet nicht nur ein schnelleres Tumorwachstum und eine verminderte Apoptoserate der malignen Zellen (Symonds *et al.*, 1994). p53-defiziente Tumorzellen zeigen darüber hinaus ein signifikant schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie mit einer Verkürzung der Überlebenszeit der Patienten im Schnitt um 2,5 Monate. Zusätzlich zeigt sich eine Korrelation zwischen *TP53*-Mutationen und komplexen Karyotypen sowie zytogenetischen Merkmalen, die ebenso wichtige prognostische Parameter darstellen (Hunter & Sallman, 2019; Wattel *et al.*, 1994).

1.1.4 Degradation von p53 durch MDM2

Neben der Mutation von *TP53* trägt die Überexpression von MDM2 zur Inaktivierung von p53 bei. Die Überexpression von MDM2 wird in über 50 % der AML-Patienten beobachtet und ist damit häufiger als Mutationen von *TP53* (Bueso-Ramos *et al.*, 1993; Oliner, Saiki, & Caenepeel, 2016). Ursprünglich wurde das 90 kDa große MDM2-Protein als Produkt des amplifizierten Genes „murine double minute 2“ (*MDM2*) in der Maus-Zelllinie 3T3DM entdeckt, die amplifizierte DNS in Form sogenannter „double minutes“ enthält. Dies sind sich selbst replizierende, abnormale, extrachromosomale Kernkörper, die während der Mitose als paarige Strukturen sichtbar werden und in ihrer Anzahl von Zelle zu Zelle variieren. Sie werden dann beobachtet, wenn sich die Zelle durch Genamplifikation und

Überexpression von Molekülen einen Wachstumsvorteil verschaffen will. Überexprimiert hat das *MDM2*-Gen in transfizierten Maus- und Rattenzellen onkogenes Potential, was auf seine wichtige Rolle in der Regulation des Zellwachstums hinweist (Fakharzadeh, Rosenblum-Vos, Murphy, Hoffman, & George, 1993; Fakharzadeh, Trusko, & George, 1991; Oliner *et al.*, 2016). MDM2, ein Protein aus 491 Aminosäuren, ist ein sehr gut analysierter Interaktionspartner von p53 und inaktiviert p53 durch Ubiquitin-abhängige Degradierung (Haupt, Maya, Kazaz, & Oren, 1997; Moll & Petrenko, 2003). Die Ubiquitinierung von p53 findet im Zellkern statt (s. Abb. 2). Der Abbau von Zielproteinen über das Ubiquitinsystem erfordert drei Enzymkomponenten, E1-E3: Das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) bindet und aktiviert Ubiquitin (Ub) über eine Thioesterbindung unter ATP-Verbrauch. Im zweiten Schritt wird Ub auf eine SH-Gruppe des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 übertragen. Dieses Enzym bildet mit dem Substraterkennungsenzym E3 einen Komplex. MDM2 selbst besitzt eine p53-spezifische E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität und bindet an C-terminale Lysinreste von p53 (Honda, Tanaka, & Yasuda, 1997). Nach Bindung von p53 an E3 bzw. MDM2 wird Ub auf p53 übertragen, p53 poly-ubiquitiniert und am Proteasom abgebaut. Die strukturellen Grundlagen der Bindung von MDM2 an p53 sind in Kapitel 1.2.1 eingehender beschrieben.

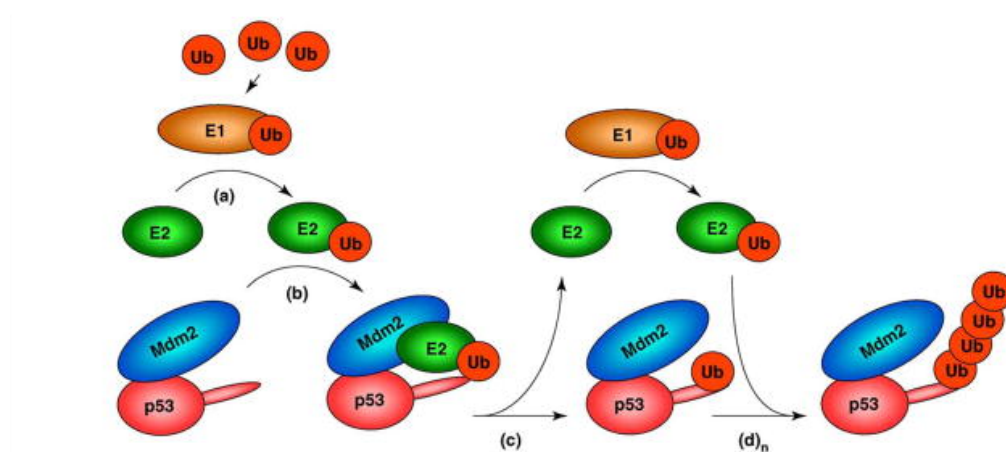


Abbildung 2: Ubiquitinierung von p53 durch MDM2.

(a) Ubiquitin (Ub) wird von E1 auf E2 übertragen. (b) E2 bindet an MDM2, das eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt und Ub auf das mit MDM2 interagierende p53 überträgt. (c) E2 dissoziiert vom p53/MDM2-Komplex, um neue Ubiquitine von E1 auf MDM2 zu übertragen. (d) Dies resultiert in einer Polyubiquitinierung von p53 und damit zum Abbau am Proteasom. Abgewandelt nach Wade *et al.* (Wade, Wang, & Wahl, 2010).

Das 26S-Proteasom ist im Cytoplasma lokalisiert und erkennt polyubiquitinierte Substrate (Ciechanover, 1998). Die Degradierung von p53 erfordert daher den Export aus dem Zellkern, welcher durch MDM2 vermittelt wird (Lindstrom, Jin, Deisenroth, White Wolf, & Zhang, 2007; Zhang & Xiong, 2001): MDM2 besitzt ein „Nuclear Export Signal“ (NES), das mit dem CRM1-Exportrezeptor interagiert und auf diese Weise MDM2-assoziierte Proteine ins Cytoplasma exportiert (Roth, Dobbstein, Freedman, Shenk, & Levine, 1998).

1.2 Interaktion zwischen p53 und MDM2

1.2.1 Biochemische Analyse der Interaktion

MDM2 reguliert nicht nur die Ubiquitinierung von p53 (Momand, Zambetti, Olson, George, & Levine, 1992), denn bereits die Bindung von MDM2 an p53 hemmt die Assoziation von p53 mit anderen Molekülen wie p53-abhängigen Promotoren und damit die Expression von Zielgenen (J. Chen, Marechal, & Levine, 1993). Durch strukturelle und funktionelle Studien ist die Interaktionsdomäne sehr gut charakterisiert. Für die Assoziation von MDM2 mit p53 sind die N-terminalen Aminosäuren 25 bis 109 von MDM2 sowie die Aminosäuren 18 bis 26 der N-terminalen Transaktivierungsdomäne von p53, die eine amphipathische α -Helix bilden, wichtig (s. Abb. 3) (Rodriguez *et al.*, 1999). MDM2 bildet mit seinen Aminosäuren 26 bis 109 eine hydrophobe Tasche, in die sich die α -Helix von p53 mit ihrer hydrophoben Seite einfügt (J. Chen *et al.*, 1993; Kussie *et al.*, 1996).

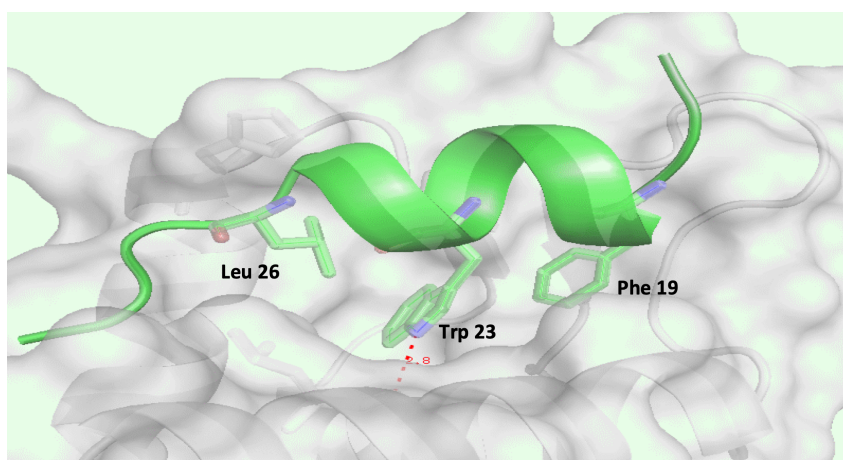


Abbildung 3: Interaktionsfläche von p53 und MDM2.

Die α -Helix von p53 (grün) ist über die Aminosäuren Leu 26, Trp 23 und Phe 19 mit MDM2 (grau) verbunden. Abgewandelt nach Khoury *et al.* (Khoury, Popowicz, Holak, & Domling, 2011).

Wie in Abbildung 3 dargestellt, bilden die zu p53 gehörenden Aminosäuren Phenylalanin 19 (Phe19), Tryptophan 23 (Trp23) und Leucin 26 (Leu26) die wichtigsten Kontaktpunkte zwischen p53 und MDM2 (A. Bottger *et al.*, 1997). Auf der Seite von MDM2 sind die N-terminalen Aminosäuren Glycin 58 (Gly58), Glutaminsäure 68 (Glu68), Valin 75 (Val75) und Cystein 77 (Cys77) essentiell. Mutationen dieser Aminosäuren hemmen den Abbau von p53 durch MDM2 (Freedman, Epstein, Roth, & Levine, 1997). Nimmt die Konzentration von p53 durch MDM2-abhängige Mechanismen ab, wird über ein durch p53 induzierbares Erkennungsmotiv auch die Transkription von *MDM2* herunter reguliert (Barak, Juven, Haffner, & Oren, 1993).

1.2.2 Der Vorläufer Nutlin-3a

Die Interaktion von p53 mit MDM2 für neue therapeutische Zwecke zu nutzen, indem man MDM2 blockiert und so p53 reaktiviert, wurde bereits 1996 untersucht. Mit Hilfe eines Phagen-Display Screens² konnten Peptide identifiziert werden, die eine hohe Affinität zur p53-Bindestelle von MDM2 aufweisen (V. Bottger *et al.*, 1996). Erfolge wurden auch mit chemischen Substanzen wie Styrylquinazolin CP-31398 erzielt, das die Ubiquitinierung von p53 inhibiert (Mularski, Malarz, Pacholczyk, & Musiol, 2019). Diese Substanz aktiviert ein Epitop an der DNS-Bindestelle von p53 und führt zu einem hohen Anteil an transkriptionell aktivem p53 (Wang, Takimoto, Rastinejad, & El-Deiry, 2003). Auch der natürliche p53-MDM2-Inhibitor Chlorofusin, ein Metabolit des Pilzes *Fusarium*, kann p53 reaktivieren, indem Chlorofusin direkt an den N-Terminus von MDM2 bindet und die Interaktion mit p53 hemmt (Duncan *et al.*, 2001). Der gegenwärtig in der Entwicklung am weitesten fortgeschrittene MDM2-Antagonist ist RG7112, ein Mitglied der Nutlin-Familie. Benannt nach dem alten Campus des Pharmakonzerns Roche in Nutley (New Jersey, USA) entwickelten Vassilev *et al.* die Nutley-Inhibitoren (Nutlins). Als Derivate eines cis-Imidazols binden die Nutlins an die Aminosäuren Phe 19, Trp 23 und Leu 26 von p53 und hemmen so die Interaktion von p53 mit MDM2 (Vassilev *et al.*, 2004). Das Enantiomer Nutlin-3a wurde von Kojima *et al.* in diversen funktionellen Tests auf seine Effektivität hin

² Das Phagen-Display stellt eine biotechnologische Methode dar, bei der aus einer großen Bibliothek Oberflächenproteine, die auf Bakteriophagen präsentiert werden, als Bindungspartner für einen bestimmten Liganden identifiziert werden können.

untersucht (Kojima *et al.*, 2005). Zellen der wt-*TP53*-Zelllinien OCI-AML-3 und MOLM-13 wurden durch Nutlin-3a in ihrem Wachstum gehemmt und die Vitalität signifikant gesenkt. Mechanistisch blockiert Nutlin-3a den Übertritt von der G₁- in die S-Phase und induziert nach prolongierter Arretierung die Apoptose (s. Abb. 4). Dies muss p53-abhängig geschehen, da die *TP53*-deletierte Zelllinie HL60 und die *TP53*-mutierte Zelllinie NB4 diesen Effekt nicht zeigen.

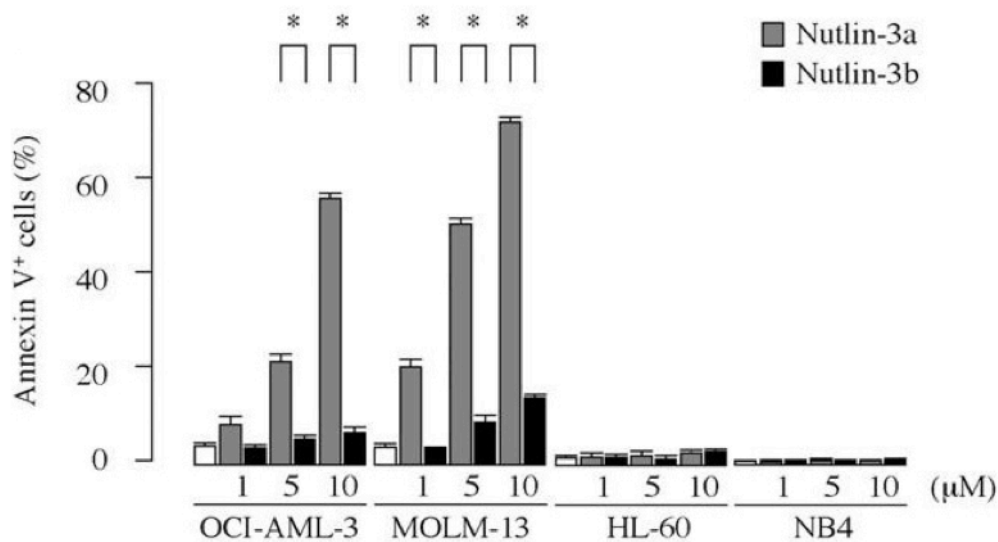


Abbildung 4: Induktion der Apoptose durch die MDM2-Antagonisten Nutlin-3a und b.

Vier verschiedene Zelllinien wurden über 48 h (24 h für MOLM-13) mit Nutlin-3a und b in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Der Anteil apoptotischer Zellen (Annexin V-positiv) wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen (Kojima *et al.*, 2005).

Nutlin-3a wurde zudem auf Blasten von 18 AML-Patienten getestet. Interessanterweise zeigte sich eine Zunahme der apoptotischen Zellen in 16 von 18 Patienten. In beiden Patienten, die nicht auf Nutlin-3a ansprachen, war *TP53* mutiert. Eine Behandlung mit Nutlin-3a führte zur Akkumulation der p53-induzierten Proteine p21 und NOXA, sowie der Caspasen 3, 8 und 9, sowohl in den wt-*TP53*-Zelllinien OCI-AML-3 und MOLM13 als auch in den Blasten der 16 Nutlin-3a-sensitiven AML-Patienten (Kojima *et al.*, 2005). RG7112 stellt eine Weiterentwicklung der Nutlins mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften dar. Mit einem IC₅₀ Wert von 18 +/- 11 nmol/l ist der neue MDM2-Antagonist in der Lage, p53 viermal schneller von MDM2 zu dissoziieren als Nutlin-3a. Zudem besitzt RG7112 einen höheren K_D-Wert von 10,7 nmol/l (Tovar *et al.*, 2013). In einer klinischen Studie der Phase I wurde 116 Patienten mit akuten

(Arm A) und chronischen Leukämien (Arm B) über 10 Tage RG7112 als orales Medikament in einer Dosierung von 20-3000 mg/m²/d verabreicht (Andreeff *et al.*, 2012). Nach einer 18-tägigen Pause erfolgte der zweite von insgesamt vier Behandlungszyklen. Ziel dieser Studie war es, Daten zur maximal tolerierbaren Dosis (MTD), sowie zur dosislimitierenden Toxizität (DLT) zu generieren, sowie Kenntnisse über Pharmakodynamik, Pharmakokinetik, und die Aktivierung p53-abhängiger Proteine zu gewinnen. In beiden Versuchsarmen wurde ein Rückgang der peripheren Blasten bzw. Lymphozyten beobachtet. RG7112 induzierte die Transkription p53-abhängiger Gene wie beispielsweise dem proapoptotischen Bax in Patienten mit wt-*TP53*. Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse litten viele Patienten unter Übelkeit, Erbrechen und Durchfall, was auf eine signifikante gastrointestinale Toxizität schließen lässt. Aus diesem Grund wurde die MTD auf 1500 mg/m²/d limitiert (Andreeff *et al.*, 2016).

1.2.3 Entwicklung neuer MDM2-Antagonisten

Die Kenntnis der Interaktionsfläche zwischen p53 und MDM2 bildet eine sehr gute Basis zur Entwicklung spezifischer „small molecules“, die die Protein-Protein-Wechselwirkung beider Faktoren blockieren. Die unten aufgeführten und in dieser Arbeit diskutierten „small molecules“ wurden mit Hilfe der webbasierten Design- und Screening-Plattform ANCHOR.QUERY entworfen (Meireles, Domling, & Camacho, 2010). Diese verfügt über eine große Bibliothek an Protein-Bausteinen. Durch Fragment-basiertes Design können diese Bausteine in einer Multikomponentenreaktion (MCR) zu den verschiedensten Molekülen zusammengesetzt werden. Zunächst wurde durch Analyse der Co-Kristall-Struktur die Protein-Protein-Interaktion analysiert und die Indol-Seitenkette der Aminosäure Trp23 von p53 als wichtigste Ankerstruktur für die Bindung der „small molecules“ identifiziert, sowie die Aminosäuren Phe19 und Leu26 als hydrophobe Pharmakophore. Um die Bindestelle von p53 an MDM2 zu simulieren, wurde im zweiten Schritt die Screeningplattform ANCHOR.QUERY nach Molekülen mit einer Indol-Struktur und den Pharmakophoren ähnelnden Co-Aminosäuren durchsucht. Unter den Treffern wurde ein α -Aminoacylamid als Grundgerüst mit dem niedrigsten Molekulargewicht und dem besten Matchingprofil, bezogen auf sterische hydrophobe und polare Wechselwirkung, ausgewählt und diente fortan

als Leitstruktur. Abbildung 5 zeigt die Multikomponentenreaktion, Abbildung 6 das endgültige Produkt, wie es von der Screeningplattform angezeigt wird.

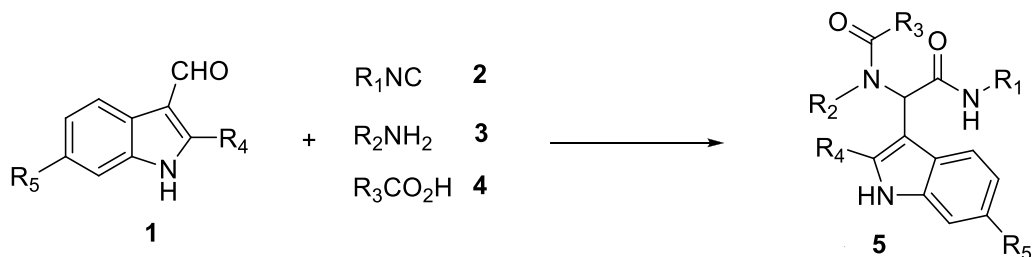


Abbildung 5: Substrate der Multikomponentenreaktion.

Darstellung der Substrate einer Vierkomponentenreaktion (4-CR): 3-Formylindol (1) reagiert mit einem Isocyanid (2), einem Amin (3) und einer Carbonsäure (4) zum Produkt α -Aminoacylamid (5) als Ausgangssubstanz für weitere Moleküle. R_1 - R_5 steht für die Position möglicher Substituenten.

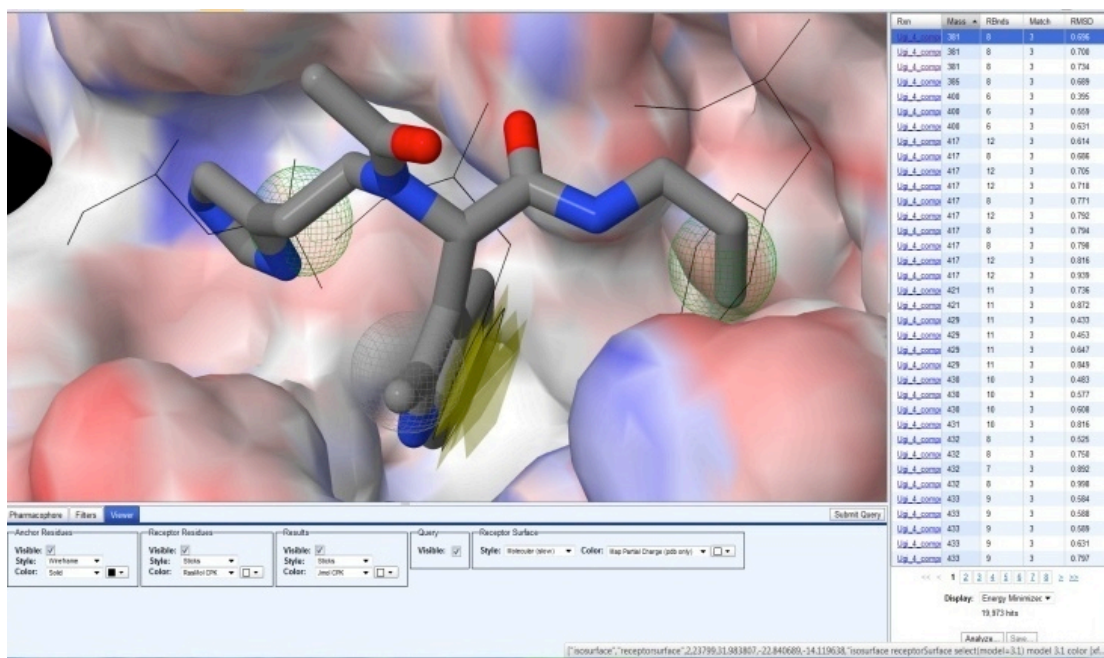


Abbildung 6: Grundgerüst der neuen p53-MDM2-Antagonisten.

Screenshot der ANCHOR.QUERY Plattform. Gezeigt ist das Produkt der 4-Komponentenreaktion (grau) mit den Hotspot -Aminosäuren Trp23 (gelb), Phe19 und Leu 26 (beide grün/schwarz) in der MDM2-Bindungstasche (Hintergrund).

Verschiedenste Derivate des vorgeschlagenen α -Aminoacylamids wurden synthetisiert und die Bindungskonstante (K_D) mittels „Antagonist Induced Dissociation Assay“ (AIDA) ermittelt (Czarna *et al.*, 2010). Weiterhin wurde der Wirkungsgrad unterschiedlicher Substituenten R_1 - R_5 untersucht. Die beste Bindungskonstante lieferte das 475 Da Molekül YH239-EE. Die in Tabelle 1

dargestellten Moleküle wurden im 100 mg Maßstab von Prof. Dömlings Arbeitsgruppe synthetisiert und sind Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit (Huang *et al.*, 2014).

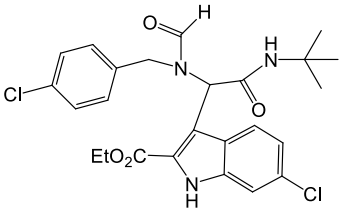
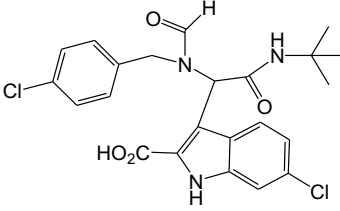
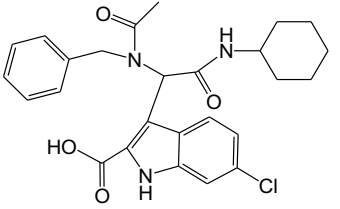
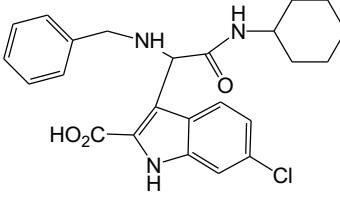
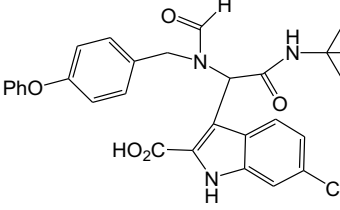
Name	#	Formel
YH239-EE	1	
YH239	2	
YH216	3	
YH230	4	
YH283	5	

Tabelle 1: Neue MDM2-Antagonisten.

Die Abkürzung YH steht für die Initialen des Produzenten (Yijun Huang). EE steht dabei für einen Ethylester-Substituenten an R₄ (Huang *et al.*, 2014).

1.3 Fragestellung

Die hohe Inzidenz der AML bei älteren Patienten verbunden mit der trotz vorhandener Therapiekonzepte hohen Mortalität verlangt in Anbetracht der demographischen Entwicklung unserer Bevölkerung nach therapeutischen Alternativen. Die bisher existierenden p53-MDM2-Antagonisten lieferten in klinischen Studien noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse, obwohl das Wirkungsprinzip vielversprechend ist (Andreeff *et al.*, 2012). Ziel dieser Arbeit war es, die biologische Wirksamkeit neuer Antagonisten zu untersuchen, die aus verschiedenen Protein-Fragmenten so zusammengesetzt wurden, dass sie sich optimal in die Bindungstasche von MDM2 einfügen, um die Wechselwirkung mit p53 zu unterbinden. Zur Beurteilung der Wirkung der neuen potentiellen MDM2-Antagonisten wurde der bereits in klinischen Studien getestete MDM2-Antagonist Nutlin-3a als Vergleichssubstanz herangezogen. Nutlin-3a diente zudem der Etablierung der experimentellen Ansätze. In Anlehnung an frühere Untersuchungen sollte die Aktivität von p53 auf den Zellzyklus, den Zellmetabolismus, die Apoptose sowie die Aktivierung p53-abhängiger Effektormoleküle in Anwesenheit eines MDM2-Antagonisten bestimmt werden (Kojima *et al.*, 2005).

Durch diese Vorversuche sollten in der Gruppe der neuen potentiellen MDM2-Antagonisten ein oder mehrere vielversprechende „small molecules“ identifiziert und anschließend in AML-Blasten von Patienten mit Erstdiagnose AML validiert werden. Langfristig sollte auf Basis der chemischen Struktur der besten „small molecules“ eine Weiterentwicklung der p53-MDM2-Antagonisten ermöglicht werden, um daraus zukünftig ein neues Medikament zu entwickeln, welches alleine oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen die bisherigen Therapieoptionen für AML-Patienten ergänzt und die Überlebenschancen verbessert.

2 Material und Methoden

Im Folgenden werden alle Chemikalien, Versuchskits und hergestellten Lösungen aufgelistet, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Die Auflistung enthält ferner alle Geräte und Verbrauchsmaterialien, einen Überblick über die verwendeten Zelllinien und das Primärmaterial. Im zweiten Abschnitt werden die Methoden vorgestellt, die zur Analyse der neuen MDM2-Antagonisten angewandt wurden.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Antikörper und Kits

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien entsprachen den routinemäßig in der medizinisch-naturwissenschaftlichen Laborforschung verwendeten Materialien und wurden wie von den jeweiligen Firmen empfohlen gelagert und eingesetzt. Die Verdünnung der Antikörper wurde im Versuchsverlauf optimiert und lag stets im durch den Hersteller festgelegten Bereich.

2.1.1.1 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Artikel	Art. No. / Cat. / Lot / Order No. / Charge / Batch	Firma
2-Mercaptoethanol	Cat. M3148 Lot BCBF9538V	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, D
30 % Acrylamide, Ultra pure ProtoGel	Lot. 02-12-09 Order No. EC-890	National diagnostics Atlanta, USA
Albumin Fraktion V	Art. Nr. 8076.2 Charge 269107746	Carl Roth GmbH & CoKG Karlsruhe, D
Ammonium persulfate (APS)	Cat. A3678 Lot MKBK1247V	Sigma Aldrich, Tokyo, Japan
Bicoll Separating Solution 500 ml	Cat. L 6115 Lot 1016 A	Biochrom AG Berlin, D
Bovine Serum Albumin (BSA)	Lot 5100302105 Order no: 130-091-376	Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, D
Bromphenolblau Na-Salz	Art. A512.1 Charge 089104056	Carl Roth GmbH & CoKG Karlsruhe, D
Complete Mini	Cat. 11836153001 Lot 13492900	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, D
Dimethylsulfoxid (DMSO) mind. 99%	Cat. 39757.02 Lot 111254	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, D
DPBS	Cat. P04-36500 Lot 5810911	PAN Biotech GmbH Aidenbach, D

Ethanol	Cat. 1.08543.0250 Lot K43758343 239	Merck KGaA Darmstadt, D
Gelatin, from porcine skin	Cat. G1890 Lot 070M0081V	Sigma Aldrich St. Louis, USA
Glycerol for molecular biology, min. 99 %	Batch 04917CJ Cat. G5516	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, D
Glycin Pufferan ≥ 99 %, p.a.	Art. Nr. 3908.2 Charge 262187095	Carl Roth GmbH & CoKG Karlsruhe, D
HEPES	Cat. 10270-106 Lot. 4169705K, 1142344	GIBCO Invitrogen Auckland, NZL
Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS)	Lot 41Q 127 4K	GIBCO Invitrogen Auckland, NZL
Horse Serum	Cat. 1605130	Thermo Fisher Scientific Rockford, USA
L-Glutamin	Nicht verfügbar	GIBCO Invitrogen Auckland, NZL
MEM Alpha Medium	Cat. 12571-063	GIBCO Invitrogen Auckland, NZL
Methanol Rotisolv $\geq 99,98$ %, Ultra LC-MS	Art. HN41.2 Charge 863841	Carl Roth GmbH & CoKG Karlsruhe, D
Milchpulver	Art. Nr. T145.3 Charge 329108410	Carl Roth GmbH & CoKG Karlsruhe, D
NET 10X pH 7,7 Inhalt: 5l H ₂ O, NaCl, 438,3 g, 93,6 g Na ₂ -EDTA (Titriplex III), 302,85 g Tris, 25 g Triton X-100,	Art. Nr. L000999	Apotheke Innenstadt Universität München München, D
Penicillin	Nicht verfügbar	GIBCO Invitrogen Auckland, NZL
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Cat. 0044071M4106	Sigma Aldrich St. Louis, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Cat. 5726 120M4014	Sigma Aldrich St. Louis, USA
Ponceau S solution	Batch 041M4342 Cat. P7170	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Cat. 161-0374 Control 350000861	BioRad Hercules, USA
Propidium Iodide staining solution	Cat. 006990500 Lot E030774	eBioscience San Diego, USA
Rh G-CSF	Cat. 300-23 Lot 111B77	Peprtech New York, USA
Rh IL-3	Cat. 200-03 Lot 090513	Peprtech New York, USA
RNAse A 1 µg/ml	Nicht verfügbar	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, D
RPMI Medium (Rosewell Park Memorial Institute 1640)	Cat. P04-17500	PAN Biotech GmbH Aidenbach, D
Salzsäure 6 mol/l – 6 N Lösung	Art.No. 00281.1 Charge 059103442	Carl Roth GmbH & CoKG Karlsruhe, D
Sodium Dodecyl Sulfate solution 10 % (SDS)	Cat. 71736 Lot BCBG3840V	Sigma Aldrich Chemie GmbH Buchs, CHE
Steriflip-NY Filter Unit	Nicht verfügbar	Merck Millipore Nottingham, UK

Streptomycin	Nicht verfügbar	GIBCO Invitrogen Auckland, NZL
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Cat. 34087 Lot ND168101A	Thermo Fisher Scientific Rockford, USA
T-PER Tissue Protein Extraction Reagent	Cat. 78510 Lot MK164291	Thermo Fisher Scientific Rockford, USA
TBS-Puffer 10X pH 7,6 Inhalt: 121 g Tris, 400 g Natriumchlorid, 5 l dest. Wasser	Art. T03292	Apotheke Innenstadt Uni München, München, D
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Cat. T9281 Lot 069K1782	Sigma Aldrich, Hong Kong, China
Thrombopoetin (TPO)	Cat. 300-18 Lot 111144	Peprtech New York, USA
Tris Pufferan ≥ 99,9 %, p.a.	Art. Nr. 4855.1 Charge 029102588	Carl Roth GmbH & CoKG Karlsruhe, D
Trypanblau	Nicht verfügbar	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, D
Trypsin/EDTA Solution	Cat. R001100	Life Technologies Bleiswijk, NLD
Tween 20	Art. Nr. 9127.1 Charge 202184305	Carl Roth GmbH & CoKG Karlsruhe, D

2.1.1.2 Antikörper

Anti-human p53 monoclonal mouse antibody, Clone D0-7, 1:400	Lot 00082520 REF. M7001	DakoCytomation Denmark Glostrup, DNK
Anti-β-Actin, 1:10000	Nicht verfügbar	Thermo Fisher Scientific Rockford, USA
ECL anti-Mouse IgG Horseradish peroxidase-linked species specific whole antibody (from sheep) 1 : 2000	Cat. NA931; 1:2000 Lot 9471742	GE Healthcare Buckinghamshire, UK
ECL anti-rabbit IgG Horseradish peroxidase-linked species specific whole antibody (from donkey), 1:2000	Cat. NA934 Lot 9471799	GE Healthcare Buckinghamshire, UK
P21 Waf1/Cip1 monoclonal rabbit antibody (12D1), 1:500	Cat. 2947S REF. 05/2012	Cell Signaling Technology Danvers, USA

2.1.1.3 Kits

Caspase Glo 3/7 Assay Kit	Cat. 05015944001	Promega Madison, USA
Cell Proliferation Reagent WST-1	Nicht verfügbar	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, D
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	Cat. 556547 Lot 13718	BD Pharmigen, San Diego, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Cat. 23227 Lot LK151116	Thermo Fisher Scientific Rockford, USA

2.1.2 Hergestellte Medien, Lösungen und Puffer

0,5 M Tris, pH 6,8, 100 ml	200 ml H ₂ O dest. + 6 g Tris Zugabe von Salzsäure bis pH 6,8
1,5 M Tris pH 8,8, 200 ml	100 ml H ₂ O dest. + 36,3 g Tris Zugabe von Salzsäure bis pH 8,8
3 % BSA, 10 ml	10 ml TBST-Puffer 1X + 0,3 g Albumin Fraktion V
5 % Milch, 100 ml	100 ml TBST-Puffer 1X + 5 g Milchpulver
Blastenmedium	500 ml MEM Alpha + 12,5 % FCS + 12 % horse serum + 20 ng/ml IL-3 + 20 ng/ml Thrombopoetin + 20 ng/ml G-CSF + 57,4 µM β-Mercaptoethanol
FACS-Fix	PBS + 5 % PFA
FACS-Puffer	PBS + 5 % FCS
Fibroblastenmedium	500 ml MEM Alpha + 12,5 % FCS + 12,5 % horse serum + 1 % Penicillin + 1 % Streptomycin + 1 % Glutamin
Freeze Medium	FCS + 20 % DMSO
G-Net 1X, 500 ml	50 ml NET 10X + 1,25 g Gelatine + 450 H ₂ O dest.
Lämmli-puffer 4X, 50 ml	20 ml SDS (8 %) + 20 ml Glycerol + 10 ml β-Mercaptoethanol + 2 g Tris + 0,05 g Bromphenolblau Mit H ₂ O dest. auf 50 ml auffüllen
Lysepuffer (714 µl)	600 µl Tissue Protein Extraktion Reagent +100 µl Complete Mini Stock Lsg +7 µl Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2 +7 µl Phosphatase-Inhibitor Cocktail 3
RPMI complete	500 ml RPMI + 10 % FCS + 100 units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 5 % HEPES + 0,292 mg/ml Glutamin

SDS Laufpuffer 10X Stock, 1 l	30,3 g Tris (0,25 M) + 144,1 g Glycin (1,92 M) + 10 g SDS (f.c. 1%) Mit H ₂ O dest. auf 1 l auffüllen
SDS Laufpuffer 1X, 1 l	100 ml SDS Laufpuffer 10X Stock + 900 ml H ₂ O dest.
TBS-Puffer 1X + 1% Tween, 1 l	100 ml TBS-Puffer 10X + 10 ml Tween 20 Mit H ₂ O dest. auf 1 L auffüllen
Transferpuffer 10X Stock, 1 l	31,2 g Tris + 144 g Glycin Mit H ₂ O dest. auf 1 l auffüllen
Transferpuffer 1X, 1 l mit 20 % Methanol	100 ml Transferpuffer 10X Stock + 200 ml Methanol Mit H ₂ O dest. auf 1 l auffüllen

2.1.3 Geräte und Software

Gerät/Software	Typ/Modell	Firma und Standort
Absorptionsmessgerät	Sunrise Basic TECAN REF: 16039400 SN: 802004645	Tecan Austria GmbH Grödig, AUT
Blottingkammer	Mini PROTEAN Tetra Cell System Ser.No. 552BR 029230	Bio Rad Hercules, USA
Durchflusszytometer	FACS Calibur 4CS E0703 Konfig Nr.: 0000009153	BD San José, USA
Elektrophoresekammer	XCell SureLock Electrophoresis Cell Ser.No. 110601-0379	Invitrogen Carlsbad, USA
Film Processor	Optimax	Protec Obsternfeld D
FloJo	Version 9	FloJo LCC Ashland, USA
Gefrierschränke	- 20 °C	Liebherr Bulle, CHE
	HERA freeze -86°C Gefrierschrank Typ HFU 686 Basic Fabrik Nr: 40648680	Thermo Fisher Scientific Langenselbold, D
Gelkassette	Cassettes, 1,5 mm Cat. NC 2015 Lot. 120501-N	Invitrogen Carlsbad, USA
Inkubator	CO ₂ Inkubator CB 150 (E3) SN: 11-13756 Art.Nr: 90400038	BINDER Tuttlingen, D
Kolbenhubpipetten		Eppendorf Hamburg, D
Kryoboxen	Mr. Frosty Cyro 1°C Freezing Container Cat. 5100-0001	Thermo Fisher Scientific München, D

Kühlschrank	2-8 °C	Liebherr Bulle, CHE
Mikroskop		Leica Microsystems Wetzlar, D
PipettBoy acu		Integra Biosciences Fernwald, D
Plattenschüttler		IKA Staufen, D
Prism	Version 6	GraphPad Software La Jolla, USA
Rollmixer	Agitator stirrer	Paul Marienfeld GmbH Lauda-Königshofen, D
Sterile Werkbank	Laminar Flow Sicherheitswerkbank Klasse II nach EN 12469 Typ BDK-SK	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH Sonnenbühl-Genkingen, D
Vortexer	Vortex Genie 2 Model No. G560E Ser. No. 2E-177081	Scientific Industries New York, USA
Wallace Software	Version 3	PerkinElmer Life and Analytical Science Turku, FIN
Wasserbad		Julabo Seelbach, D
Zellzählgeräte	Vi-Cell Beckmann Coulter AF 47079 Ident.Nr.: L 10 75 14	Beckmann Coulter GmbH Krefeld, D
	Countess automated cell counter Cat. C10281 SN: 10064 -018	Invitrogen, Life Technologies GmbH Darmstadt, D
Zentrifugen	Multifuge 3 S-R Baujahr 2001	Heraeus Kendro Laboratory Products Osterode, D
	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG Hamburg, D

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Amersham Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare Buckinghamshire, UK
Falcon 15/50 ml high clarity Polypropylene	BD New Jersey, USA
Falcon 5 ml Polystyrene round bottom	BD New Jersey, USA
RP New Medical X-Ray Screen film blue sensitive	CEA GmbH Hamburg, D
Gel Blot Paper	Whatman, Part of GE Buckinghamshire, UK

Multiwell Platten 15/50 ml	BD New Jersey USA
Pasteurpipetten	VWR Darmstadt, D
Pipettenspitzen 0,5-20/2-200/ 50-1000 µl	Eppendorf Hamburg, D
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 1,5/2 ml	Eppendorf Hamburg, D
25/75 cm ² Zellkulturflasche aus Polystyrene, straight neck 0,2 µm vented blue plug seal cap	BD New Jersey, USA

2.1.5 Zelllinien

Für das Projekt wurden vier verschiedene AML-Zelllinien (s. Tab. 2) verwendet, die freundlicherweise von der AG Bohlander (Helmholtz München) zur Verfügung gestellt wurden und ursprünglich von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, D) stammen.

Name	Zelltyp	<i>TP53</i>	Weitere Mutationen
OCI-AML-3	AML FAB M4	wt	NPM1 mut: DNMT3A R882C
MOLM-13	AML FAB M5	wt	FLT3-IDT (nicht exprimiert): CBL deltaExon8 mut
HL60	AML	deletiert (bi-allelisch)	<i>MYC</i> amplifiziert
NB4	Akute promyelozytische Leukämie	Missense Mutation	t(15;17) PML-RARA Fusion

Tabelle 2: In der vorliegenden Arbeit verwendete Zelllinien mit *TP53*-Status.

Ergänzend wurden MDM2-Antagonisten auf der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 getestet. Auch diese Zellen wurden dankenswerter Weise von Kolleginnen und Kollegen der AG Jeremias (Helmholtz München) zur Verfügung gestellt.

2.1.6 AML-Blasten

2.1.6.1 Materialgewinnung

In Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki wurden nach schriftlicher Einwilligung Knochenmarksproben von 8 Patienten mit der Erstdiagnose AML gesammelt. Das Ethikvotum findet sich im Anhang.

2.1.6.2 Isolierung und Kryokonservierung der Blasten

Für die Isolierung der Blasten nach der Ficoll-Methode wurden die Blut- oder Knochenmarkproben in einem 50 ml Falcon mindestens 1:2 mit DPBS verdünnt und 25 ml der Suspension auf 12 ml Ficoll-Lösung, die in einem 50 ml Falcon vorgelegt war, geschichtet. Nach 30-minütiger Zentrifugation (2000 rpm, Beschleunigung Stufe 3 ohne Bremse, Raumtemperatur) wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) in der weiß-grauen Schicht zwischen Plasma und Ficoll mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und in ein neues Falcon überführt. Die Zellen wurden in 5-10 ml RPMI suspendiert, gewaschen, gezählt und schließlich in einer Dichte von $1,25\text{--}2,5 \times 10^7$ Zellen/ml in 100 % FCS aufgenommen. Nach Zugabe des Freeze Mediums und Transfer in Kryo-Röhrchen wurden die Zellen in einen Mr. Frosty Freezing Behälter, der mit Isopropanol gefüllt war, überführt, auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und fortan in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.1.6.3 Kultivierung von AML-Blasten

Zur Verbesserung des Wachstums von AML-Blasten wurde bei Versuchen mit Primärmaterial in Zellkulturschalen zunächst ein Wachstumsboden aus adhärennten MS-5 Mausfibroblasten (DSMZ) generiert. An die subkonfluente Zellschicht aus Mausfibroblasten siedeln sich die AML-Blasten an und vermehren sich optimal. Je nach Größe der Kulturschale wurden $2,4 \times 10^4$ (24-Well-Platte) oder $5,0 \times 10^4$ (12-Well-Platte) Mausfibroblasten pro Well ausgesät.

2.1.6.4 Molekulargenetische Analyse

Die Analyse des Karyotyps sowie des Mutationsstatus der Proteine NPM1 und FLT3 erfolgte im Rahmen der Diagnosestellung im Labor für Leukämiediagnostik an der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern in München, die Untersuchung von zwei Patientenproben auf *TP53*-Mutationen im Max von Pettenkofer-Institut in München.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow Sicherheitswerkbank vorgenommen. Ausgenommen davon war lediglich die Färbung der Zellen mit Trypanblau für die Zellzählung.

2.2.1.1 Kulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in 25 ml Zellkulturflaschen mit Filterdeckel bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert

2.2.1.2 Passagieren der Zellen

Die verschiedenen Zelllinien wurden nach Angaben des DSMZ und nach eigenen Erfahrungen zweimal pro Woche gesplittet: Suspensionszellen wurden mit RPMI complete Medium auf eine Zelldichte von $2-3 \times 10^5$ /ml verdünnt. Die adhärenenten Mausfibroblasten und HCT116 Zellen wurden alle 3-4 Tage mittels Trypsinierung passagiert und in einer Dichte von $4-8 \times 10^5$ /75 cm² Flasche in MEM Alpha Medium (Fibroblasten) bzw. $0,9 \times 10^5$ /75 cm² Flasche in RPMI complete Medium ausgesät (HCT116).

2.2.1.3 Zellzählung

Für jede Zellzählung wurden 20 µl der jeweiligen Zellsuspension zur Bestimmung der Vitalität mit dem gleichen Volumen Trypanblau-Lösung (0,4 %) gefärbt. Trypanblau diffundiert durch beschädigte Membranen toter Zellen. Daher werden

nur ungefärbte, intakte Zellen gezählt. Die Zellzählung erfolgte maschinell mit dem „Countess automated cell counter“ (Invitrogen), das ebenfalls nach dem Prinzip der Neubauer-Zählkammer funktioniert. Das maschinelle Verfahren wurde wiederholt durch manuelle mikroskopische Zellzählung kontrolliert. Bei beiden Verfahren wurden 10 µl des Zell-Farbstoff-Gemisches unter das Deckblatt einer Zählkammer pipettiert. Bei manueller Messung wurden 4 der 16 Felder unter dem Mikroskop ausgezählt und der Mittelwert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Bei großer Probenanzahl wurde der Vi-Cell Beckman Coulter verwendet.

2.2.2 Lösen und Verdünnen der neuen MDM2-Antagonisten

Die zu testenden Substanzen lagen in Pulverform vor und wurden mit DMSO in Lösung gebracht (Endkonzentration 20 mM). 15 Minuten nach Zugabe von DMSO wurde die Lösung steril zentrifugiert und bei 4 °C gelagert. Da sich in ersten Verdünnungsreihen zeigte, dass die Substanzen nach Zugabe größerer Mengen des RPMI Mediums ausfielen, wurden nachfolgend die Substanzen schrittweise dauerhaft in Lösung gebracht (s. Tab. 3). Zur Einstellung der gewünschten Endkonzentrationen der Antagonisten wurde die entsprechende Menge an Medium, ebenfalls schrittweise, zugegeben.

Reagenz	Volumenanteil (VT)
MDM2-Antagonist (20 µM) in DMSO	1
Ethanol absolut (100 %)	1
Medium (z. B. RPMI)	2
DMSO (100 %)	1

Tabelle 3: Verdünnung von MDM2-Antagonisten.

Schrittweise Zugabe von n Volumenteilen Ethanol, Medium und DMSO zur Verbesserung der Löslichkeit der neuen MDM2-Antagonisten. Beispiel: 10 µl MDM2-Antagonist + 10 µl Ethanol + 20 µl Medium + 10 µl DMSO.

2.2.3 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Dieses in der quantitativen Analyse von Zelloberflächenmolekülen gängige Verfahren beruht auf der lasertechnischen Anregung fluoreszenzmarkierter

Antikörper, die zuvor eine Bindung mit Molekülen auf der Zelloberfläche eingegangen sind. Hierin liegt ein klarer Vorteil gegenüber der normalen Durchflusszytometrie, die mittels Streulichtmessung lediglich Größe („forward scatter“, FSC) und Inhalt („side scatter“, SSC) der Zellen bestimmt. Die zu analysierenden Zellen werden zu einem vom Untersuchungsschwerpunkt abhängigen Zeitpunkt vor der Messung mit monoklonalen Antikörpern inkubiert. Diese Antikörper sind direkt, oder indirekt über einen Sekundärantikörper, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Das Durchflusszytometer presst die Zellen hydrodynamisch durch eine Messkammer, in der sie von einem Laser zur Fluoreszenz angeregt werden. Das Fluoreszenzlicht wird gefiltert und von drei wellenlängenspezifischen Fotosensoren detektiert. Im Fall des in dieser Arbeit verwendeten „fluorescence-activated cell sorting“ (FACS)-Gerätes wurde ein zweiter Dioden-Laser eingesetzt, um einen weiteren Fluoreszenzkanal zu schaffen. Nach Digitalisierung des optischen Signals werden die Messergebnisse in Form von zweidimensionalen Dot-Plots dargestellt. Dabei entspricht jeder Punkt einer Zelle. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo.

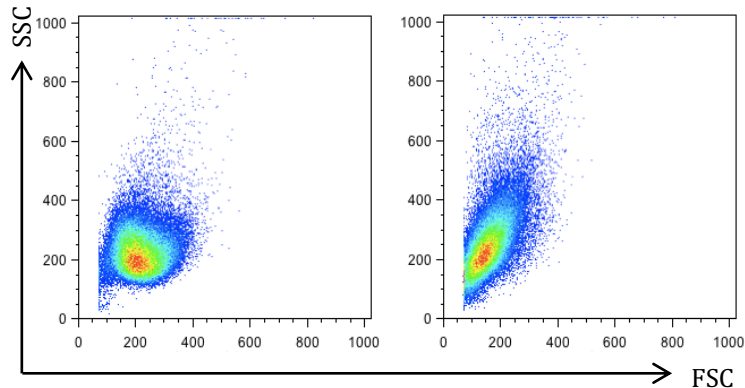
2.2.4 FITC Annexin V/ Propidiumiodid-Färbung

Diese Methode dient sowohl zur Bestimmung der Anzahl toter Zellen in einer Population, als auch zur Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen (Vermes, Haanen, Steffens-Nakken, & Reutelingsperger, 1995). Annexin V ist ein 35-36 kDa großes, Calcium-abhängiges Protein und ist hier an einen Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markierten Antikörper gebunden. Es bindet an Phosphatidylserin (PS), das nach Destabilisierung der Zellmembran während der Apoptose von der inneren Membranschicht in die äußere verlagert, und so für den Farbstoff Annexin V zugänglich gemacht wird. Da die Translokation von PS bereits im Anfangsstadium der Apoptose beginnt, werden über Färbung mit Annexin V auch frühapoptotische Zellen detektiert (Koopman, Reutelingsperger, Kuijten, Keehnen, Pals, & van Oers, 1994). Propidiumiodid (PI) ist ein ergänzender Kernfarbstoff, der nur durch die permeablen Membranen geschädigter Zellen diffundiert und damit Zellen färbt, die sich in der Spätphase der Apoptose befinden oder nekrotisch sind (Vermes *et al.*, 1995).

Umfang und Intensität der Färbungen wurden mittels FACS ausgewertet. Wie in Abbildung 7 dargestellt, wandern noch vitale Zellen im Laufe des Zelltods aus dem

Annexin V-negativ/PI-negativ-Gate bzw. -Quadranten (links unten; LUQ) zunächst entgegen dem Uhrzeigersinn nach rechts und lassen sich bei noch intakter Membran nur mit Annexin V anfärben. Der Annexin V-positiv/PI-negativ-Quadrant (rechts unten; RUQ) enthält somit frühapoptotische Zellen. Im weiteren Verlauf der Apoptose geht die Membranintegrität zunehmend verloren und die Zellen nehmen zusätzlich PI auf. Sie wandern dementsprechend in den rechten oberen Annexin V-positiv/PI-positiv-Quadranten (ROQ), typisch für die späte Apoptose. Die Zellen im linken oberen Quadranten (LOQ), die sich nur mit PI anfärben lassen (Annexin V-negativ/PI-positiv) werden als nekrotisch betrachtet (Thomas, Gopalakrishnan, Somasagara, Choudhary, & Raghavan, 2016).

(A)



(B)

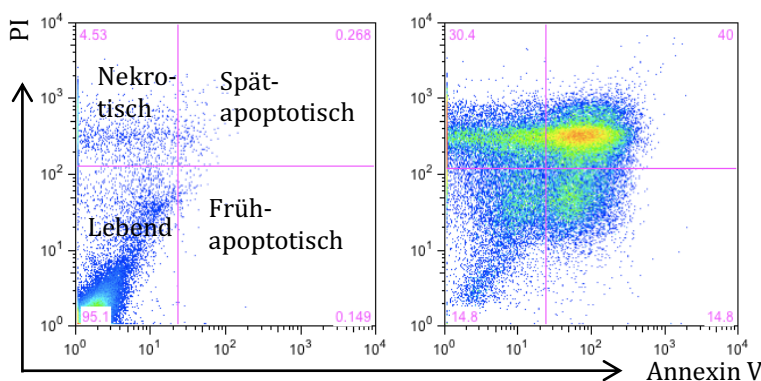


Abbildung 7: Färbung von Zellen mit FITC Annexin V und PI.

Dot-Plots zur Beurteilung der Zellvitalität nach 72-stündiger Inkubation mit einem MDM2-Antagonisten. (A): Analyse der Gesamtzellpopulation mittels FSC und SSC. (B): Analyse der verschiedenen Stadien des Zelltods mittels (FITC-)Annexin V/PI-Färbung. Die Zahlenwerte stehen für den Prozentanteil der Zellen in jedem Quadranten.

Nach den Herstellerangaben des „FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I“ (BD Pharmingen™) wurde die zu untersuchende Zellsuspension, mindestens aber $2-3 \times 10^5$ Zellen, nach 72-stündiger Inkubation mit der Testsubstanz in ein 15 ml Falcon überführt und zentrifugiert (5 Minuten, 550 rcf, 20 °C, Anlauf- und

Abbremsstufe 9). Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet zum Waschen in 5 ml 4 °C kaltem DPBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und auch dieser Waschschrift wiederholt. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Pipette vollständig abgenommen und das Zellpellet nach Resuspension in 100 µL 1X Binding Puffer in ein 5 ml Falcon überführt. Die Endkonzentration sollte 1×10^6 Zellen/ml betragen. Zum Färben der Zellen wurden je 5 µl FITC Annexin V und PI zugegeben und die Proben 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 400 µL 1X Binding Puffer waren die Proben bereit für die Analyse mittels FACS. Es wurde jeweils die Gesamtzellpopulation ausgewertet (s. Abb. 7A), sowie die Prozentanteile des RUQ, ROQ bzw. LOQ, bezogen auf die Gesamtzellpopulation (s. Abb. 7B) zur Ermittlung der Zu- oder Abnahme der apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen innerhalb des Probenmaterials.

2.2.5 Analyse der SubG₁-Population im Zellzyklus

Eine Zellzyklusanalyse liefert wertvolle Informationen über die Vitalität der Zellen. Der Zellzyklus besteht aus vier Phasen mit einer charakteristischen Zahl an Chromosomensätzen/Chromatiden (s. Abb. 8A). Zellen mit einem einfachen Chromosomensatz bzw. 2n Chromatiden befinden sich in der Ruhe-Phase (G₀) bzw. „Gap“-Phase 1 (G₁). Die Replikation der DNS während der an die G₁-Phase anschließenden S-Phase (S) führt zu duplizierten Chromosomensätzen bzw. 4n Chromatiden. Es folgt eine weitere „Gap“-Phase 2 (G₂), in der alle vitalen Zellen zwei Chromosomensätze (4n) besitzen, die in der darauffolgenden Mitose (M-Phase) auf zwei Tochterzellen mit je einem einfachen Chromosomensatz (2n) verteilt werden. Wichtig für die vorliegende Arbeit war die Bestimmung der SubG₁-Phase, in der Zellen einen geringeren DNS-Gehalt als G₁-Zellen aufweisen. SubG₁-Zellen befinden sich im mittleren oder späten Stadium der Apoptose. Für die Messung des Zellzyklusprofils mittels Durchflusszytometrie wurden zunächst zwei Protokolle getestet. Nach Protokoll 1 wurden 1×10^6 Zellen 24 h nach Inkubation mit der Testsubstanz zentrifugiert und zweimal mit 10 ml DPBS / 0,1 % BSA gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml DPBS resuspendiert (ad 1×10^6 /ml) und die Suspension mit 3 ml 4 °C kaltem 70 % Ethanol gut gemischt, um eine Verklumpung der Zellen zu vermeiden. Nach einstündiger Fixierung in Ethanol wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen, das Zellpellet in 200 µL DPBS resuspendiert und in ein 5 ml Falcon überführt. Nach

Zugabe von 5 μl PI, das in doppelsträngige DNS interkaliert und diese färbt, sowie Behandlung mit 50 μl RNase für 3 h bei 4 °C, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Protokoll 2 unterschied sich von diesem Protokoll nur dahingehend, dass die Zellen gleich anfangs für 30 Minuten im Dunkeln bei 37 °C mit RNase behandelt wurden. Da beide Protokolle ähnliche Ergebnisse bei Probemessungen lieferten, wurde standardmäßig nach Protokoll 1 verfahren. Das Histogramm für eine typische Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie ist in Abb. 8B dargestellt. Die X-Achse zeigt die Intensität der Färbung der DNS mit PI und korreliert mit dem DNS-Gehalt der Zellen. Die Höhe der Kurven entspricht der Anzahl der Zellen mit der jeweiligen PI Intensität. Der SubG₁-Anteil ermittelt sich aus der „area under curve“ (AUC).

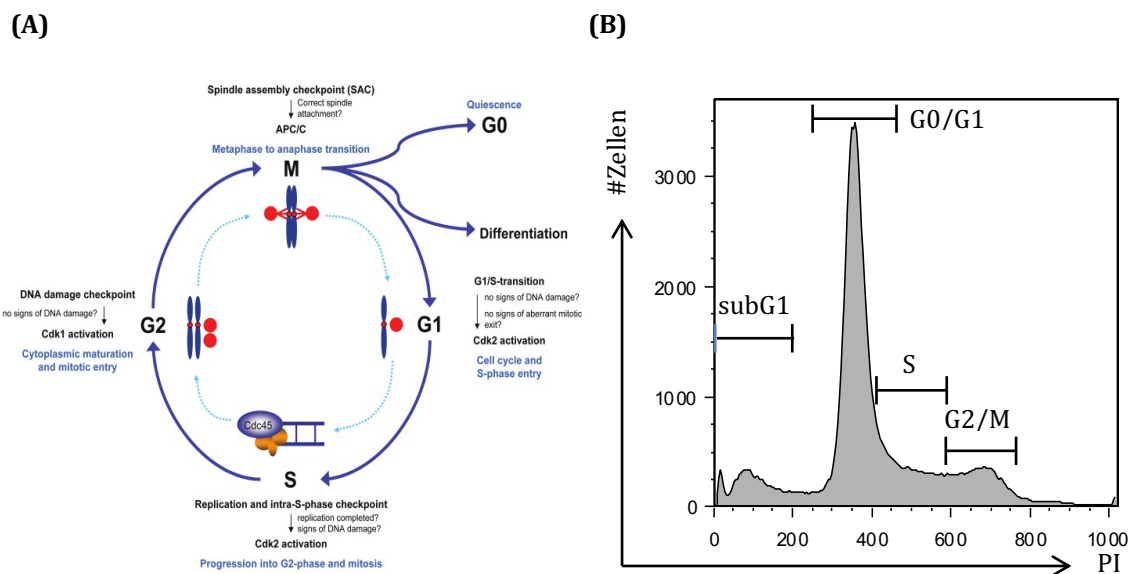


Abbildung 8: Darstellung der Zellzyklusphasen.

(A): Schematische Darstellung der verschiedenen Zellzyklusphasen mit dem jeweiligen Chromosomen-Gehalt. Abgewandelt nach Schnerch *et al.* (Schnerch *et al.*, 2012).

(B): Durchflusszytometrische Darstellung der Zellzyklus-Phasen. Zellpopulationen mit einer hohen Anzahl vitaler Zellen zeigen erwartungsgemäß einen kleinen Peak in der subG₁-Phase und einen großen Peak in der G₀/G₁-Phase.

2.2.6 Water-Soluble-Tetrazolium-1 (WST-1)-Test

Dieser Test dient der Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen und ist somit ein Indikator für Zellwachstum, Zellproliferation und Zytotoxizität. Der Test beruht auf der Umwandlung des Ausgangsstoffes WST-1 durch mitochondriale Dehydrogenasen in das Reaktionsprodukt Formazan. Da die Reaktion stark von

der glykolytischen Produktion von NADH abhängig ist, korreliert die Menge an produziertem Formazan direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver und intakter Zellen im Ansatz. Die Zellen wurden nach variabler Inkubationszeit (24-72 h) mit den MDM2-Antagonisten in einer Dichte von 5×10^5 /ml in den Wells einer 96-Well Platte ausgesät. Dafür wurden je Well 50 µl Zellsuspension mit 50 µl gelöstem Antagonisten gemischt, bei 37 °C inkubiert und 4 h vor Ende der jeweiligen Inkubationszeit mit 10 µl WST-1-Reagenz versetzt. Die mit dem Umsatz von WST-1 zu Formazan einhergehende Absorptionsänderung wurde in einem ELISA Platten-Reader gemessen. Zur Ermittlung des EC₅₀-Wertes wurde der zu testende Antagonist in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 50 µM eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels Prism Graph Pad (Version 7). Alle Messungen wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt zusammen mit Kontrollzellen, die nur mit Lösungsreagenz (DMSO) behandelt waren.

2.2.7 Caspase-Glo 3/7-Test

Die Aktivierung der Caspase „cysteine aspartic acid-specific protease“ (Caspase) - Kaskade erfolgt durch extrinsische und intrinsische proapoptische Signalwege. Extrinsische Signalwege können durch Apoptose-induzierende Liganden, die an membranständige Todesrezeptoren binden, angeschaltet werden. Nach Aktivierung des „Death-Inducing Signalling Complex“ (DISC), bestehend aus Rezeptor- und zytosolischen Adaptermolekülen, kommt es zur kaskadenartigen proteolytischen Aktivierung der Caspasen 8, 3 und 7 (Boatright & Salvesen, 2003). In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Caspase-Glo 3/7 Kits die Aktivität der Caspasen 3 und 7 und damit die Apoptose bestimmt. Das spezifische und luminogene Caspase-Glo 3/7-Substrat wird in Gegenwart der aktiven Caspasen 3 und 7 gespalten und nachfolgend durch Luciferase in Aminoluciferan umgewandelt. Die dabei freigesetzte Lumineszenz entspricht direkt der Caspase 3/7-Aktivität. Zellen einer beliebigen Zellreihe wurden in einer Dichte von 10^2 /µl auf einer 96-Well-Platte mit einem Volumen von 100 µl/Well ausgesät. Zu definierten Zeitpunkten (1, 6, 24 h) wurden pro Well 100 µl eines gelösten p53-MDM2-Antagonisten in unterschiedlichen Konzentrationen (5, 10, 20 µM) hinzugegeben. Jede Versuchsreihe wurde in Triplikaten angelegt. Die Testreihen enthielten eine Negativkontrolle aus unbehandelten Zellen sowie Zellen, die mit DMSO, dem Lösungsmittel der Antagonisten, inkubiert waren. Vor Zugabe des

30

Reagens wurde das Substrat mit dem dazugehörigen Puffer gemischt. Anschließend wurden 100 µl Zellsuspension aus jedem Well in eine für die luminometrische Messung geeignete Platte transferiert und 100 µl Reagenz zugegeben. Die Platte wurde 30 Sekunden mit 300 rpm auf einem Platten-Shaker geschüttelt. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Lumineszenz mittels Luminometer und Wallac-Software.

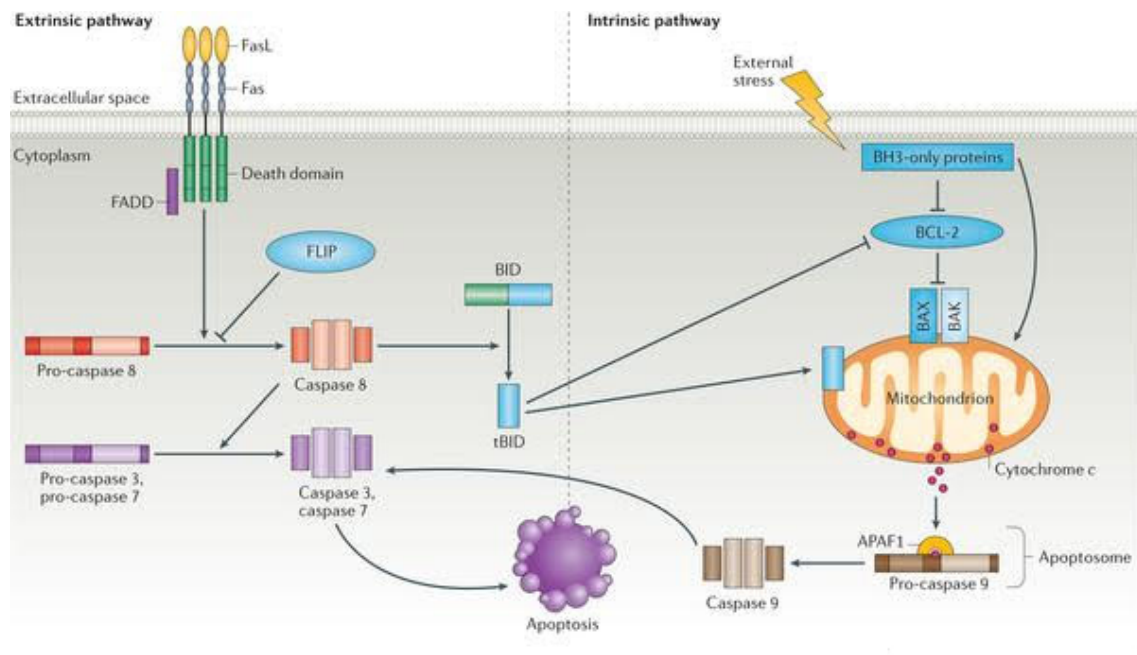


Abbildung 9: Zusammenspiel von extrinsischem (links) und intrinsischem (rechts) Signalweg der Apoptose mit kaskadenartiger Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7. Abgewandelt nach Cuda et al. (Cuda, Pope, & Perlman, 2016).

2.2.8 Western Blot

Die Detektion spezifischer Proteine in Zelllysaten erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörpern durch Western Blotting.

2.2.8.1 Herstellung von Zelllysaten

Nach Behandlung mit einem MDM2-Antagonisten für 2-24 h wurden 4×10^6 Zellen geerntet, abzentrifugiert und das Zellpellet zunächst für 15 Minuten mit 300 µl Lysepuffer auf Eis inkubiert und währenddessen regelmäßig mit einer Pipette gemischt. Nach weiterer Inkubation für minimal 24 h jedoch maximal 48 h bei -80°C wurde die Suspension erneut zentrifugiert, der Überstand in ein neues

Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur Verwendung bei nun -20 °C aufbewahrt. Parallel wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle verwendet.

2.2.8.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Bicinchoninsäure (BCA)-Tests unter Verwendung des Pierce BCA Protein Assay Kits. Das zugrundeliegende Prinzip beruht auf der Biuret-Reaktion, einer Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch Proteine im alkalischen Milieu. BCA bildet einen wasserlöslichen Komplex mit Cu^{+} , welcher eine starke Absorption bei 562 nm zeigt. Die Quantifizierung der Proteinmenge wird durch Vergleich mit einer parallel gemessenen BSA-Eichkurve mit Standardkonzentrationen von 0-1 mg/ml ermittelt (Smith *et al.*, 1985). Zur Denaturierung der Proteine wurden 50 µl Probenvolumen bzw. entsprechend verdünnte BSA-Standards mit 1 ml Pierce Solution (Reagens A : Reagens B = 50:1) in Eppendorf-Gefäßen bei 60 °C für 15 min erhitzt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C wurden 200 µl jeder Probe in eine 96-Well Platte pipettiert. Dabei wurden Triplikate verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte am Photometer.

2.2.8.3 SDS-Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Zur Herstellung von diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen wurde das Mini-Protean System von BioRad verwendet. 12 % (v/v) Trenn- und 4 % (v/v) Sammelgele wurden nach den unten stehenden Angaben hergestellt:

Formel für ein 12 %-Trenngel (10 ml Gesamtvolumen):	Formel für ein 4 %-Sammelgel (5 ml Gesamtvolumen):
$0.33 \cdot X = \text{Menge von 30 \% Acrylamide [ml]}$ + 2,5 ml von 1.5 M Tris pH 8.8 + 100 µl von SDS + (7,35 - Menge von Acrylamide [ml]) H_2O millipore + 5 µl von TEMED + 50 µl von 10 % APS	0.66 ml von 30 % Acrylamide + 1.26 ml von 0,5 M Tris pH 6.8 + 50 µl von 10 % SDS + 3,3 ml H_2O millipore + 5 µl von TEMED + 25 µl von 10% APS

Tabelle 4: Formel für die Herstellung der Sammel- und Trenngele.

Die Zugabe von TEMED erfolgte jeweils unmittelbar vor dem Gießen des Trenn- bzw. Sammelgels. Zunächst wurde das Trenngel in eine vorgefertigte Gelkassette gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung wurde das Isopropanol komplett entfernt, auf das Trenngel die Sammelgellösung pipettiert und ein 10-Well-Kamm inseriert. Das auspolymerisierte Gel wurde in die Gelelektrophorese Kammer eingesetzt und die Kammer mit 1X SDS-Elektrophorese Puffer gefüllt. Zu 30 µg des zu analysierenden Zelllysates wurden ad 30 µl H₂O sowie 10 µl 4x Lämmli-puffer gegeben, die Proben 15 Minuten bei 95 °C denaturiert und sofort in die Geltaschen pipettiert. Eine Geltasche wurde mit 10 µl vorgefärbtem Proteinstandard beladen. Schließlich wurde die Elektrophoresekammer mit 1X Laufpuffer aufgefüllt. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei konstant 80 V bis die Proben das Trenngel erreicht hatten und dann bei konstant 120 V bis die Lauffront am unteren Ende des Gels angekommen war (ca. 1,5 h).

2.2.8.4 Blotting

Der Transfer der über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF Membran folgte mit einem Mini Trans-Blot-System. Dazu wurde ein Sandwich, bestehend aus 2 Filterpapieren, einem Blotting Schwamm, dem Gel, der Membran, darauf einem weiteren Blotting Schwamm sowie weiteren 2 Filterpapieren hergestellt. Das Sandwich wurde in die Halterung und diese so in die Blotting-Kammer gesetzt, dass das Gel in Richtung der Kathode (-/schwarz) gerichtet war. Anschließend wurde die Blotting-Kammer mit 1X Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte über Nacht bei 4°C und konstant 50 mA. Ein Rührfisch in der Blotting-Kammer sorgte für eine kontinuierliche Verteilung des Puffers. Zum Nachweis des Proteintransfers wurde die Membran anschließend mit Ponceau-S gefärbt und dann für 1 h mit TBST/5 % Milch in einem Falcon bei Raumtemperatur auf einem Rollmixer geblockt. Nach dem Waschen der Membran mit TBST wurde der primäre Antikörper in TBST/5 % Milch (Endvolumen 5 ml) verdünnt, zur Membran im Falcon gegeben und je nach Antikörper entweder über Nacht bei 4 °C (z.B. Anti-p21) oder für 4 h bei Raumtemperatur (z.B. Anti-β-actin)

auf dem Rollmixer inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem ebenfalls in TBST/5 % Milch verdünnten Sekundärantikörper (anti-Maus-HRP oder anti-Kaninchen-HRP) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen und 5-minütiger Inkubation mit dem Substratgemisch (Enhancer- und Peroxidase Solution im Verhältnis 1:1) des chemilumineszenten West Pico Kits wurde die Membran in eine Gelkassette überführt. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe gelang nach anschließender Antikörper-abhängiger Belichtung von Röntgenfilmen.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die Signifikanz der Unterschiede zwischen unbehandelten Zellen, der Vergleichssubstanz Nutlin-3a und den neuen Verbindungen wurde mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet. Dazu wurde das Programm Prism Graph Pad verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der Wirksamkeit von Nutlin-3a

Um die Wirksamkeit der neuen MDM2-Antagonisten zu beurteilen, wurde in dieser Arbeit zunächst der etablierte MDM2-Antagonist Nutlin-3a auf vier Zelllinien, OCI-AML-3, MOLM-13, HL60 und NB4 in Anlehnung an Kojima *et al.* getestet (Kojima *et al.*, 2005). Zur Evaluierung der Wirksamkeit wurde jeweils zu definierten Zeitpunkten nach Zugabe des Antagonisten mittels Durchflusszytometrie die SubG₁-Zellpopulation und nach Annexin V/PI-Färbung die Aktivierung der Apoptose ermittelt. Über den Umsatz von WST-1 wurde der metabolische Zustand analysiert. Zum Nachweis p53-regulierter Proteine wurde durch Western Blotting die Induktion des Zellzyklusinhibitors p21 detektiert.

3.1.1 Nutlin-3a inhibiert das Wachstum in p53-wt-Zellen

Zunächst wurden vier verschiedene AML-Zelllinien mit dem validierten Inhibitor Nutlin-3a behandelt. Die verwendeten Zelllinien unterscheiden sich im *TP53*-Status: OCI-AML-3 und MOLM-13 Zellen exprimieren p53-wt, in der Zelllinie HL60 ist das *TP53*-Gen auf Chromosom 17 deletiert, in NB4 Zellen durch eine Missense Mutation funktionell inaktiv. Die genannten Zelllinien wurden für 96 h in Gegenwart von 0, 1, 5, 10 und 20 µM Nutlin-3a bzw. zur Kontrolle mit dem Nutlin-Lösungsreagens DMSO kultiviert (Kojima *et al.*, 2005). Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte alle 24 h durch maschinelle Auszählung.

Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, war die Inhibition des Zellwachstums durch Nutlin-3a erwartungsgemäß Zelllinien-spezifisch und abhängig von der verwendeten Konzentration.

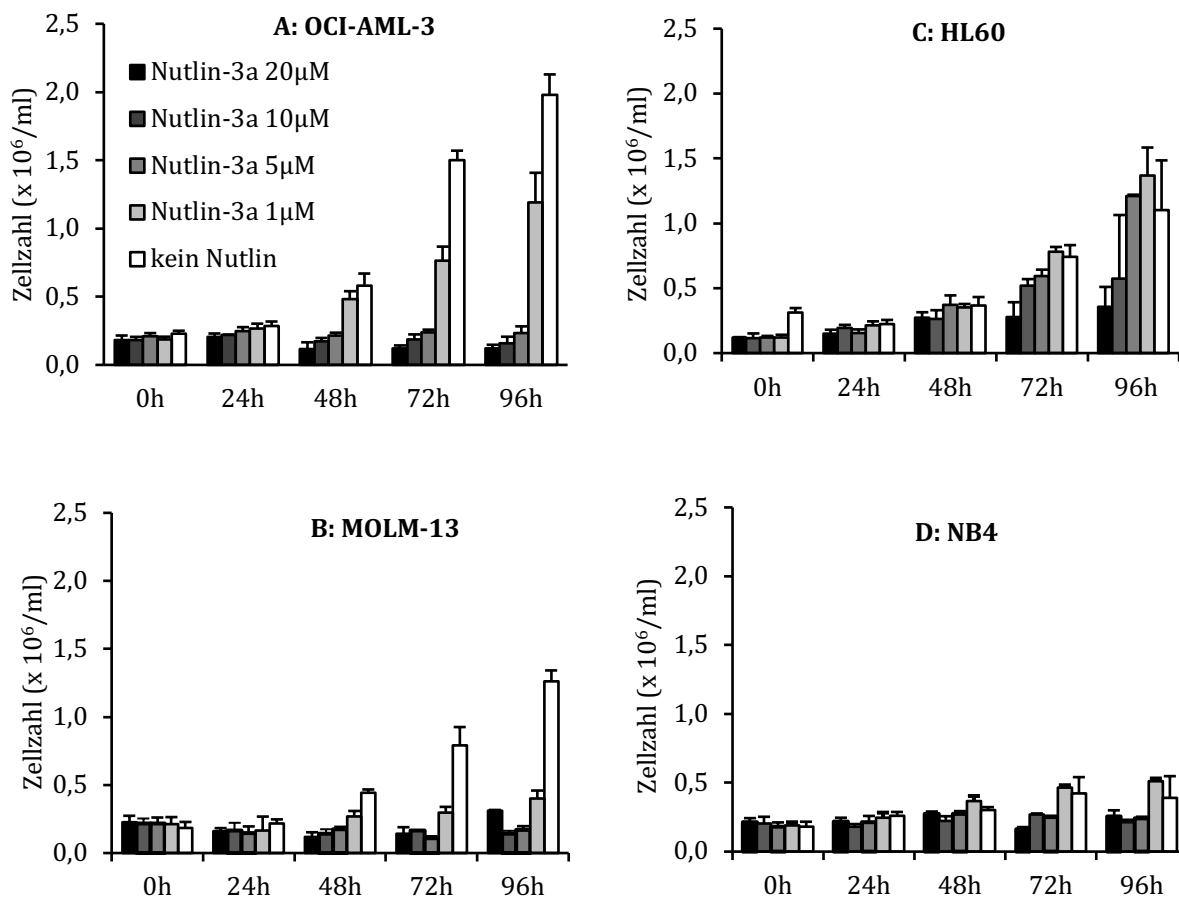


Abbildung 10: Zelllinien-spezifische Hemmung des Zellwachstums durch Nutlin-3a.

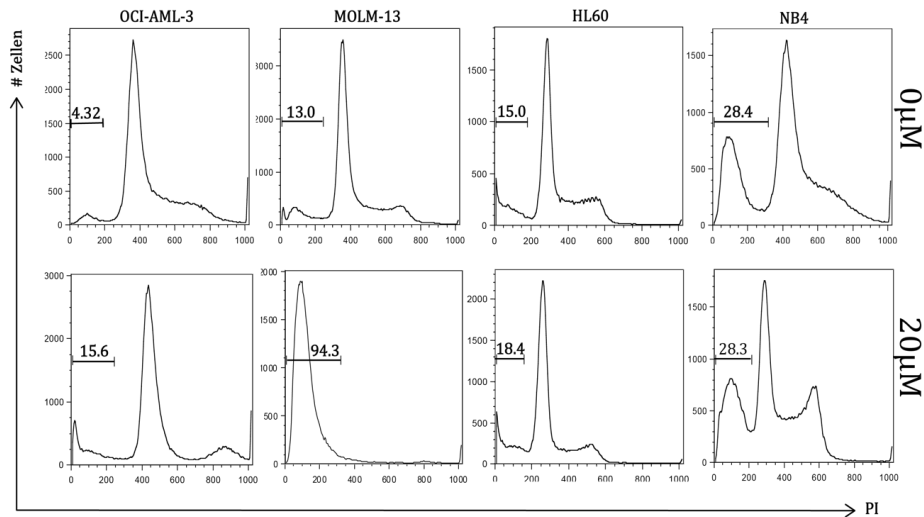
Bestimmung des Zellwachstums von OCI-AML-3- (A), MOLM-13- (B), HL60- (C) und NB4- (D) Zellen nach Behandlung mit 0, 5, 10 und 20 μM Nutlin-3a über 0, 24, 48, 72 und 96 h. Die Säulen stellen Mittelwerte dar ($n=3$), die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

Die Zelllinien OCI-AML-3 und MOLM-13 (beide p53-wt Status) erwiesen sich in einem Konzentrationsbereich von 5-20 μM Nutlin-3a als sensitiv, während Nutlin-3a in diesem Konzentrationsbereich das Wachstum von HL60-Zellen, in denen *TP53* auf beiden Allelen deletiert ist, nicht beeinflusste. Da NB4-Zellen, in denen p53 funktionell inaktiv ist, selbst in Abwesenheit des Antagonisten kaum wuchsen, kann diese Zelllinie für diese Testreihe nicht ausgewertet werden.

3.1.2 Nutlin-3a erhöht die SubG₁ Population in p53-wt-Zellen

P53 arretiert über die Transkription regulatorischer Proteine den Zellzyklus, um beispielsweise nach Schädigung durch Noxen die Replikation fehlerhafter DNS zu unterbinden. Zur Bestimmung der durch Nutlin-3a induzierten Arretierung des Zellzyklus wurde nach Färbung der Zellen mit PI die Verteilung der Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (s. Abb. 11).

(A)



(B)

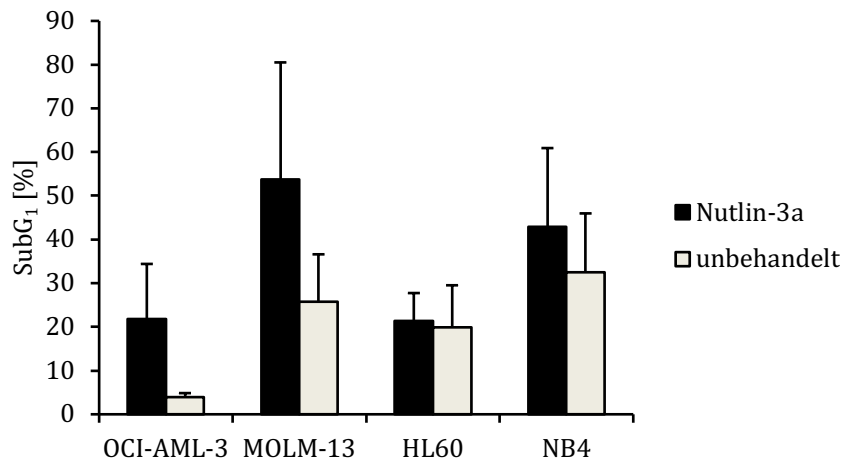


Abbildung 11: Messung der SubG₁-Population 24 h nach Behandlung mit Nutlin-3a.

(A): Histogramme der Durchflusszytometrie von OCI-AML-3-, MOLM-13-, HL60- und NB4-Zellen nach Behandlung mit 20 μM Nutlin-3a über 24 h (untere Reihe) bzw. ohne Nutlin-3a (obere Reihe). Der Anteil der SubG₁-Phase ist in % angegeben.

(B): Anteil der OCI-AML-3-, MOLM-13-, HL60- und NB4-Zellen in der SubG₁-Phase nach 24 h Behandlung mit 20 μM Nutlin-3a. Die Säulen zeigen die Mittelwerte (n=3), die Fehlerbalken die Standardabweichung.

Wie aus dem Histogramm ersichtlich, war nach Behandlung mit 20 μM Nutlin-3a über 24 h erwartungsgemäß in p53-wt-Zelllinien der Anteil von Zellen in der SubG₁-Phase erhöht. Bei OCI-AML-3-Zellen entsprach dies einer Steigerung um 11,23 %, bei MOLM-13 sogar von 81,3 % gegenüber unbehandelten Zellen. In p53-defizienten HL60-Zellen hingegen war der Anteil an SubG₁ Zellen nur marginal um 3,4 % erhöht. Da NB4-Zellen bereits ohne Nutlin-3a einen hohen Anteil an SubG₁-Zellen zeigten, der sich nach Zugabe von Nutlin-3a nicht änderte, konnte diese

Zelllinie auch hier nicht in die Auswertung einbezogen werden (s. Abb. 11A). In biologischen Replikaten bestätigte sich die hohe Sensitivität von MOLM-13-Zellen gegenüber Nutlin-3a (s. Abb. 11B). Der Anteil an MOLM-13-Zellen in der SubG₁-Phase lag bei 53,7 % (SD ± 26,8 %), während die SubG₁-Population von OCI-AML-3-Zellen nur 21,7 % (SD ± 12,6 %) betrug. Die p53-defiziente Zelllinie HL60 lag mit einem Mittelwert von 17,8 % (SD ± 2,7 %) nur knapp darunter. Dies weist darauf hin, dass Nutlin-3a eventuell auch nicht MDM2-p53-abhängige Seiteneffekte hervorgerufen hatte.

3.1.3 Nutlin-3a reduziert die metabolische Aktivität und Proliferation von OCI-AML-3- und MOLM-13-Zellen

Neben der Zellzyklusanalyse wurde die metabolische Aktivität bzw. Proliferation unbehandelter und mit Nutlin-3a behandelter Zellen mit Hilfe des WST-1 Reagenz verglichen. Hierzu wurden Zellen der vier zu untersuchenden Zelllinien über 48 h in Gegenwart von 0, 1, 5, 10 und 20 µM Nutlin-3a kultiviert. Die metabolische Aktivität unbehandelter Zellen wurde als 100 % gesetzt.

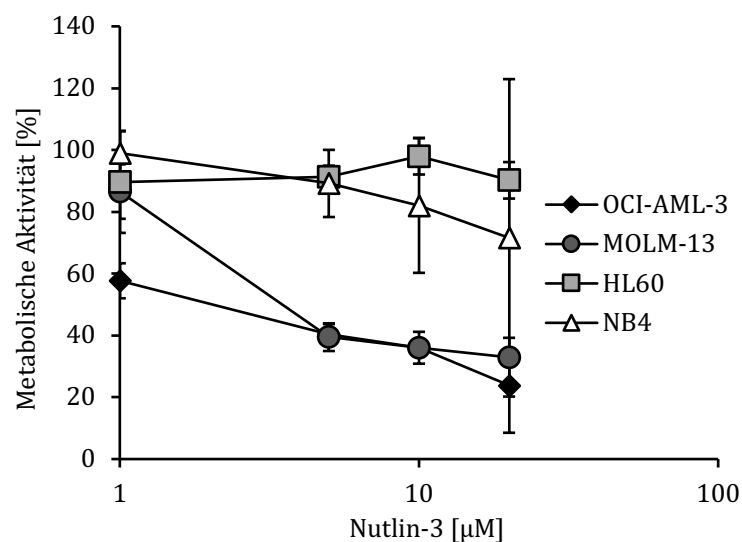


Abbildung 12: Messung der metabolischen Aktivität/Proliferation mit dem WST-1 Reagenz.

Inkubation von OCI-AML-3-, MOLM-13-, HL60- und NB4-Zellen über 48 h mit 1, 5, 10 und 20 µM Nutlin-3a. Die metabolische Aktivität [%] ist im Vergleich zur Aktivität unbehandelter Zellen [= 100 %] dargestellt. Die Werte wurden aus 3 biologischen Replikaten (n=3) ermittelt, die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

Die Behandlung mit Nutlin-3a über 48 h senkte die metabolische Aktivität in den p53-wt-Zellen OCI-AML-3 und MOLM-13 deutlich. In Gegenwart von 5 bzw. 10 µM Nutlin-3a lag die verbliebende metabolische Aktivität von OCI-AML-3-Zellen bei

40,3 % (SD \pm 3,3 %) bzw. 36,0 % (SD \pm 5,2 %), von MOLM-13-Zellen bei 39,5 % (SD \pm 4,5 %) bzw. 35,9 % (SD \pm 1,9 %). 20 μ M Nutlin-3a reduzierten die metabolische Aktivität weiter auf 23,9 % (SD \pm 15,4 %) in OCI-AML-3 Zellen und 32,9 % (SD \pm 1,4 %) in MOLM-13 Zellen (s. Abb. 12). In Übereinstimmung mit den vorher beschriebenen Ergebnissen (s. Abb. 11) wurde keine Nutlin-3a konzentrations-abhängige Änderung der metabolischen Aktivität von HL60 Zellen verzeichnet. Auch in diese Analyse konnten wegen sehr hoher Standardabweichungen NB4-Zellen nicht einbezogen werden.

3.1.4 Nutlin-3a induziert Apoptose und Nekrose in p53-wt-Zellen

P53 induziert als Transkriptionsfaktor die Expression proapoptotischer Proteine. Um nach längerer Exposition mit Nutlin-3a den Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen zu ermitteln, wurden Zellen der vier Linien über 72 h in Gegenwart von 20 μ M Nutlin-3a kultiviert, anschließend mit Annexin V und PI gefärbt, und mittels FACS analysiert. Die in Abbildung 13 dargestellten Säulendiagramme geben die Werte aus den Summen der jeweiligen RUQ, LOQ, ROQ wieder (s. Abb. 7).

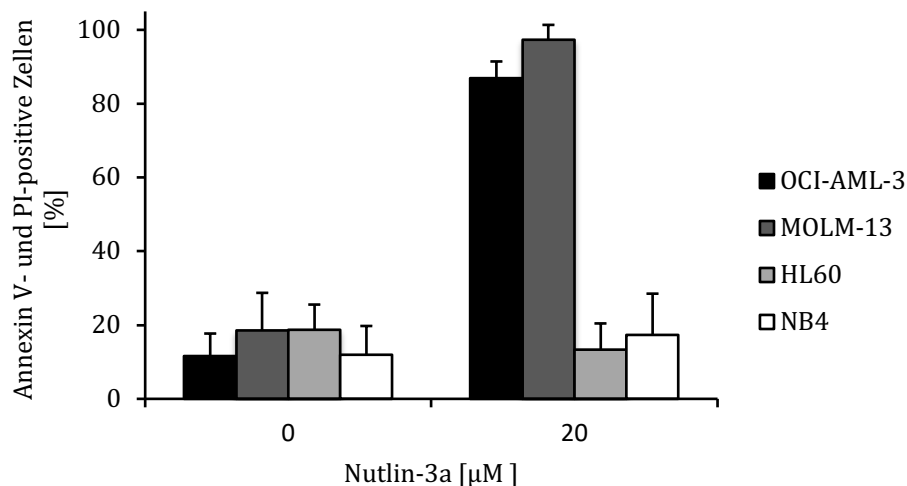


Abbildung 13: Induktion von Apoptose und Nekrose durch Nutlin-3a.

Bestimmung des Anteils apoptotischer (Annexin V-positiv) und nekrotischer (PI-positiv) Zellen mittels FACS. OCI-AML-3-, MOLM-13-, HL60- und NB4-Zellen wurden für 72 h mit 20 μ M Nutlin-3a behandelt oder unbehandelt belassen. Die Säulen stellen die Mittelwerte (n=3) dar, Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

In den p53-wt-Zelllinien OCI-AML-3 und MOLM-13 war der Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 20 μ M Nutlin-3a

deutlich erhöht: Mit einem Anteil von 86,9 % (SD \pm 4,5 %) bzw. 97,4 % (SD \pm 4,0 %) waren unter diesen Bedingungen OCI-AML-3- und MOLM-13-Zellen nahezu komplett nicht vital, während der Anteil apoptotischer/nekrotischer HL60- und NB4-Zellen gegenüber den Kontrollzellen unverändert niedrig blieb (s. Abb. 13).

3.1.5 Nutlin-3a ist eine geeignete Kontrollsubstanz für die Testung neuer MDM2-Antagonisten

In den vorherigen Versuchen konnte die Wirksamkeit des MDM2-Antagonisten Nutlin-3a in den relevanten Zellsystemen weitgehend nachvollzogen werden (Kojima *et al.*, 2005). Nutlin-3a reduzierte vor allem in höheren Konzentrationen die Vitalität der p53-wt-Zellen OCI-AML-3 und MOLM-13 deutlich. Bereits nach 24-stündiger Behandlung wurde ein Anstieg von Zellen in der SubG₁-Phase beobachtet. Parallel dazu nahm die metabolische Aktivität bzw. Zellproliferation nach 48-stündiger Exposition ab, während apoptotische und nekrotische Zellen 72 h nach Behandlungsbeginn erheblich zunahmen. Die Effekte wurden nicht in p53-defizienten HL60-Zellen beobachtet. Dies weist darauf hin, dass, wie erwartet, die Wirkung von Nutlin-3a p53-abhängig erfolgt. Leider verhielt sich die p53-Mutanten-Zelllinie NB4 nicht wie erwartet: Bei höheren Konzentrationen von Nutlin-3a nahm die metabolische Aktivität zwar ähnlich wie bei OCI-AML-3- und MOLM-13-Zellen ab, die Population an SubG₁-/apoptotischen Zellen jedoch nicht zu. Die Eignung dieser Zelllinie für die Analyse neuer Antagonisten bleibt daher fraglich.

3.2 Die Bestimmung der biologischen Aktivität neuer potentieller MDM2-Antagonisten

3.2.1 YH239-EE induziert Apoptose und Nekrose in den p53-wt-Zelllinien MOLM-13 und OCI-AML-3

Zur Evaluierung der Wirksamkeit der neuen potentiellen MDM2-Antagonisten wurden Zellen der vier Linien OCI-AML-3, MOLM-13, HL60 und NB4 über 72 h mit den Substanzen YH239-EE, YH239, YH216, YH230 und YH283 inkubiert und anschließend für die Bestimmung apoptotischer und nekrotischer Zellen mit Annexin V und PI gefärbt. Diese Methode wurde deshalb für die erste Analyse gewählt, da sie sich in den Vorversuchen als wenig störanfällig erwiesen hatte. Die Antagonisten wurden in einer Konzentration von 20 μ M verwendet, da Nutlin-3a bei dieser Konzentration deutlich Apoptose und Nekrose induziert hatte.

72 h nach Behandlung wurden die Zellen geerntet, mit Annexin V und PI gefärbt und durch FACS der Anteil apoptotischer sowie nekrotischer Zellen ermittelt. Abbildung 14 zeigt die Resultate für MOLM-13-Zellen. Zur besseren Darstellung der Quantifizierungen sind die Prozentanteile der einzelnen Quadranten jeweils in einer Tabelle unter dem FACS-Bild zusammengefasst. Da die Werte im Programm FloJo auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet wurden, ergibt die Summe aller Quadranten nicht exakt 100 %. Im Vergleich mit Nutlin-3a als MDM2-Kontrollantagonist zeigte nur die Substanz YH239-EE einen ähnlichen Effekt. Inkubation mit 20 μ M Nutlin-3a führte zu insgesamt 99,88 % Annexin V-positiven/PI-negativen, Annexin V-positiven/PI-positiven und Annexin V-negativen/PI-positiven MOLM-13-Zellen, Inkubation mit 20 μ M YH239-EE immerhin zu einem Anteil von 84,86 %. Die übrigen vier getesteten Substanzen, YH239, YH216, YH230 und YH283, waren wirkungslos und induzierten weder Apoptose noch Nekrose, die Zellen blieben nach Behandlung vital.

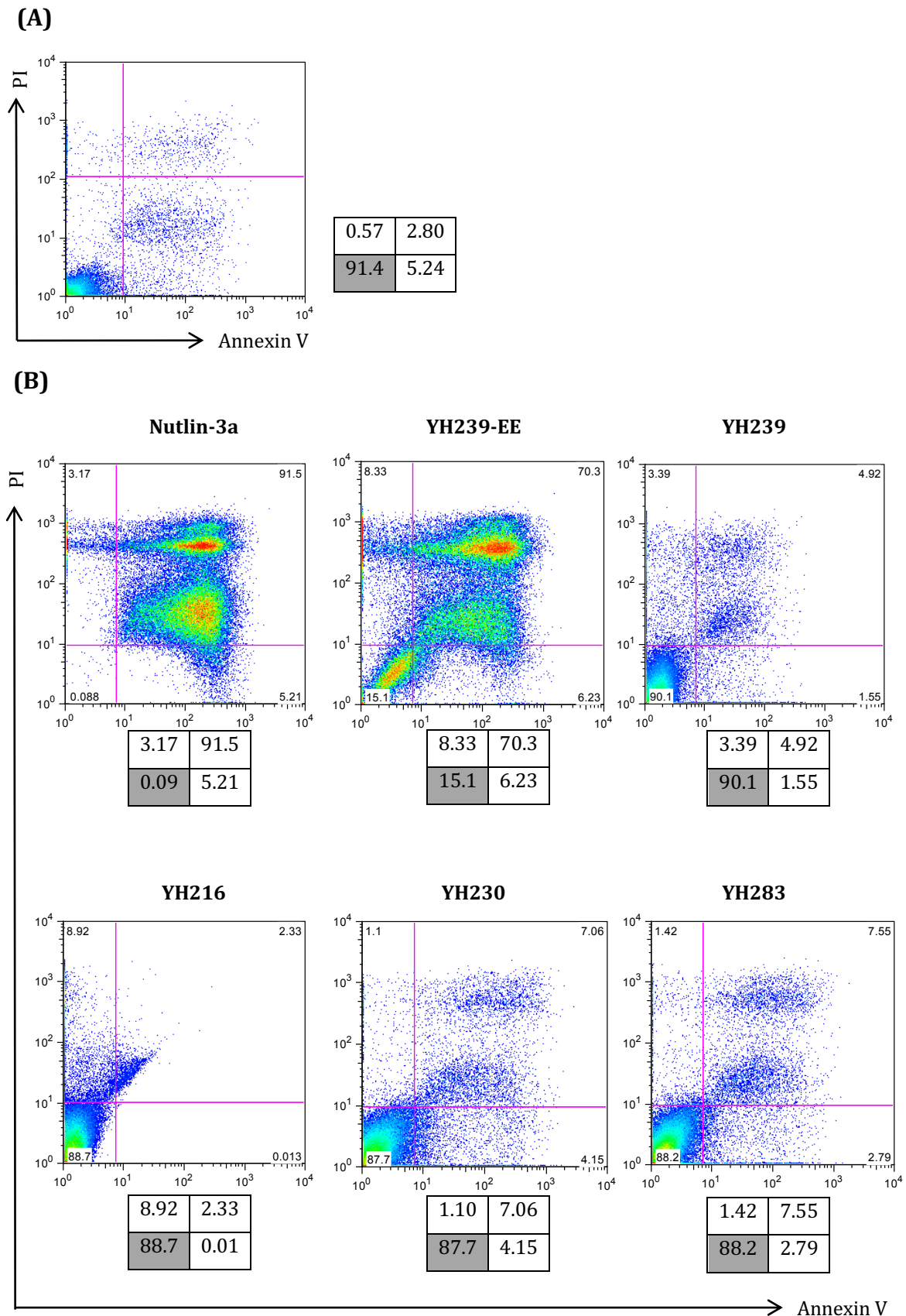


Abbildung 14: Analyse der neuen Antagonisten durch Annexin V/PI-Färbung.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind als Dot Plots dargestellt. Die Tabellen zeigen die %-Anteile der Signale in den vier Quadranten. Das grau hinterlegte Kästchen gibt den Anteil der vitalen Zellen an. Mit Annexin/PI gefärbte MOLM-13-Zellen unbehandelt (A) sowie mit 20 μ M YH239-EE, YH239, YH216, YH230, YH283 und Nutlin-3a behandelt (B) nach 72 h.

Um zu prüfen, ob dieses Ergebnis Zelllinien-spezifisch war, wurde die gleiche Analyse in OCI-AML-3-, HL60- und NB4-Zellen durchgeführt. Für die Auswertung wurde wiederum die Summe aus RUQ, ROQ und LOQ herangezogen. Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, induzierten Nutlin-3a und YH239-EE in OCI-AML-3-Zellen, nicht jedoch in HL60- und NB4-Zellen Apoptose und/oder Nekrose. Auch in dieser Testreihe vermochten die restlichen neuen Substanzen nicht gezielt Apoptose zu induzieren; mit einem Anteil < 15 % an nicht vitalen Zellen lag der Wert nur geringfügig über den Werten der unbehandelten Kontrollen.

Zelllinie	Nutlin-3a	YH239-EE	YH239	YH216	YH230	YH283	Unbeh.
OCI-AML-3 [%]	81,4	85,2	7,6	6,7	6,9	4,8	4,9
MOLM-13 [%]	99,9	84,9	9,9	11,3	12,3	11,8	8,5
HL60 [%]	7,2	15,4	11,8	10,6	11,6	10,3	11,3
NB4 [%]	17,3	82,2	5,5	5,7	5,8	5,4	3,8

Tabelle 5: Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Behandlung von 4 AML-Zelllinien mit neuen potentiellen MDM2-Antagonisten.

Bestimmung apoptotischer und nekrotischer Zellen mittels Annexin V/PI-Färbung und FACS. Inkubation der vier angegebenen Zelllinien mit 20 µM YH239-EE, YH239, YH216, YH230, YH283 oder Nutlin-3a für 72 h. Die Werte zeigen die Summe der LOQ, ROQ, und RUQ in %.

3.2.2 YH239-EE erhöht die SubG₁-Zellpopulation in MOLM-13- und OCI-AML-3-Zellen

Um die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe zu untermauern, wurden zunächst MOLM-3-Zellen für nur 24 h mit den neuen Antagonisten inkubiert und die Verteilung der Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Wie aus Abbildung 15 hervorgeht, wurde durch Nutlin-3a ein nahezu vollständiger Zellzyklusarrest induziert (SubG₁-Anteil von 94,3 %). Wenngleich weniger effizient, induzierte auch YH239-EE einen Zellzyklusstop (SubG₁-Anteil von 48,8 %). SubG₁-Zellen wurden zwar auch in den Zellzyklusprofilen der mit YH239, YH216, YH230 und YH283 behandelten Zellen gemessen, jedoch war in diesen Histogrammen gleichzeitig der Anteil an G₁- und G₂/M-Zellen (YH239, YH216) bzw. nur an G₁-Zellen (YH230) oder nur an G₂/M-Zellen (YH283) stark erhöht.

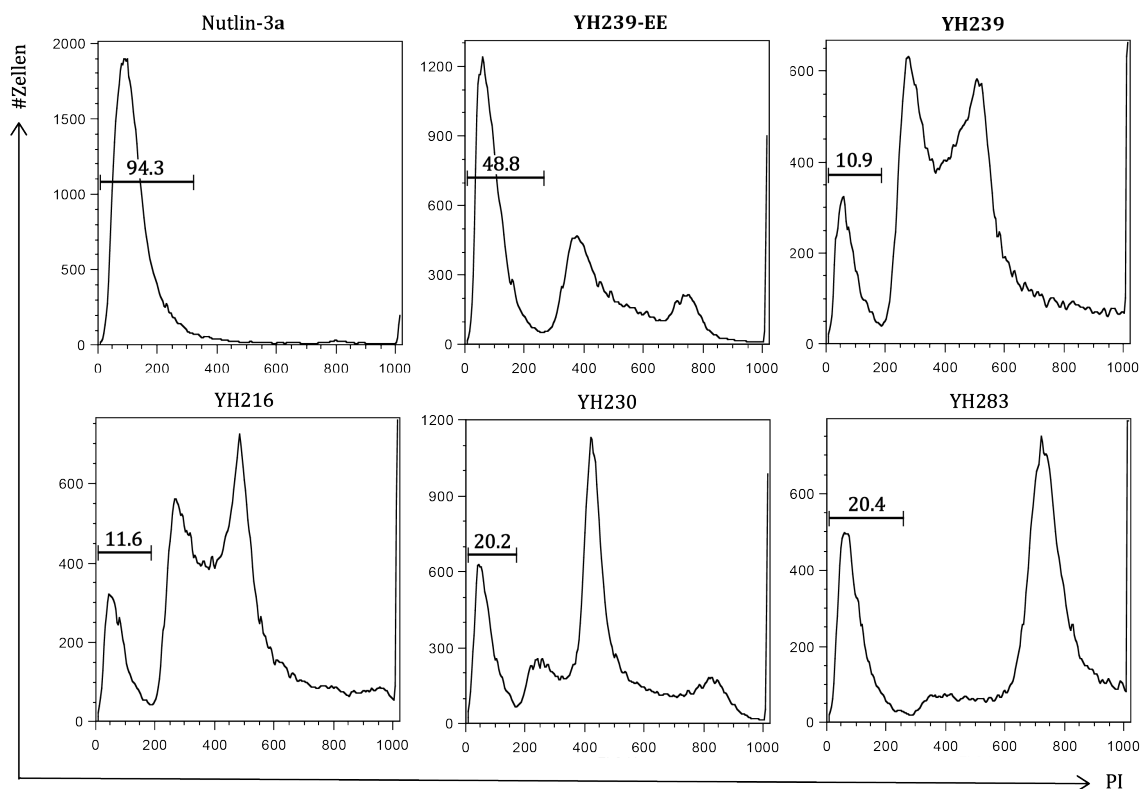


Abbildung 15: Zellzyklusanalyse von MOLM-13-Zellen nach Behandlung mit neuen potentiellen MDM2-Antagonisten.

MOLM-13-Zellen wurden 24 h mit 20 μ M YH239-EE, YH239, YH216, YH230, YH283 oder Nutlin-3a behandelt und die Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die SubG₁-Phase ist in % angegeben.

Unter den gleichen Konditionen wurde anschließend die biologische Wirksamkeit der betreffenden Substanzen in OCI-AML-3-, sowie HL60- und NB4-Zellen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Zelllinie	Nutlin-3a	YH239-EE	YH239	YH216	YH230	YH283	Unbeh.
OCI-AML-3 [%]	36,3	35,5	2,2	3,2	3,3	3,3	3,2
MOLM-13 [%]	94,3	48,8	19,9	11,6	20,2	20,4	6,0
HL60 [%]	14,9	15,0	14,2	12,2	14,7	14,5	14,9
NB4 [%]	54,7	75,1	45,9	48,5	50,5	42,0	45,6

Tabelle 6: Bestimmung der SubG₁-Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie.

Incubation der vier indizierten Zelllinien mit 20 μ M YH239-EE, YH239, YH216, YH230, YH283 oder Nutlin-3a über 24 h. Die Werte zeigen den Anteil an SubG₁-Zellen in %.

OCI-AML-3-Zellen erwiesen sich als weniger sensitiv gegenüber YH239-EE (SubG₁ von 35,5 %) im Vergleich zu MOLM-13-Zellen. Der SubG₁-Anteil der HL60-Zellen blieb mit oder ohne Substanzbehandlung konstant. Da in der NB4-Linie bereits fast 50 % der unbehandelten Zellen nicht vital waren (SubG₁-Anteil von 45,6 %), sind

keine weiteren Aussagen möglich. Insgesamt bestätigte sich, dass unter den neuen Test-Substanzen nur YH239-EE einen Zellzyklusarrest zu induzieren vermochte.

3.3 Detaillierte Analyse der biologischen Wirkung von YH239-EE

Der Vergleich der chemischen Strukturen der neuen potentiellen MDM2-Antagonisten zeigt, dass nur YH239-EE eine Ethylester-Gruppe besitzt, während die übrigen Substanzen an dieser Stellen eine freie Säure tragen (s. Tab. 1). Diese Ethylester-Gruppe bietet möglicherweise einen Vorteil, um die Interaktion von MDM2 mit p53 zu hemmen. In den folgenden Experimenten wurde daher die Wirksamkeit von YH239-EE näher untersucht, wobei YH239, stellvertretend für die Substanzen mit einer freien Säure-Gruppe, als Negativkontrolle und Nutlin-3a weiterhin als Positivkontrolle dienten.

3.3.1 Induktion von Apoptose und Nekrose durch YH239-EE

Nach Behandlung von OCI-AML-3-, MOLM-13-, HL60- und NB4-Zellen mit 20 μ M YH239-EE, YH239 oder Nutlin-3 für 72 h wurde der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen durch Färbung mit Annexin V/PI ermittelt.

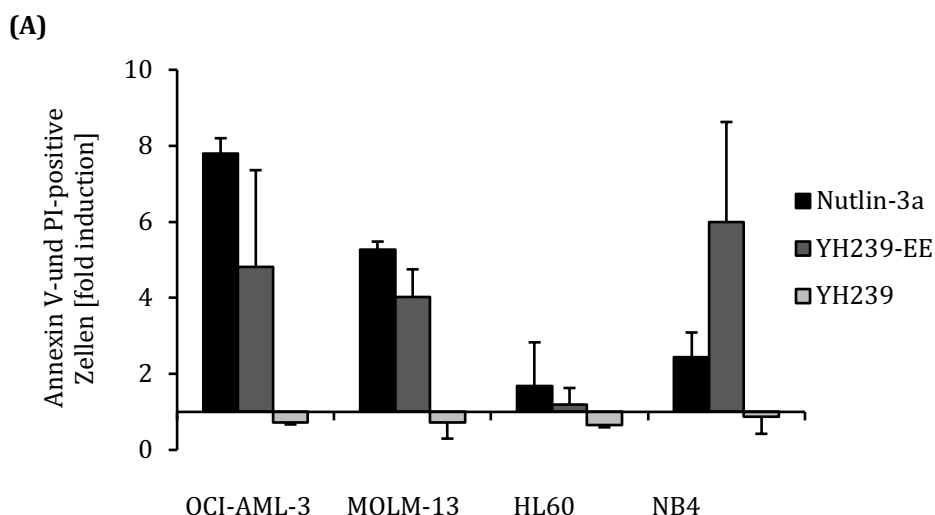
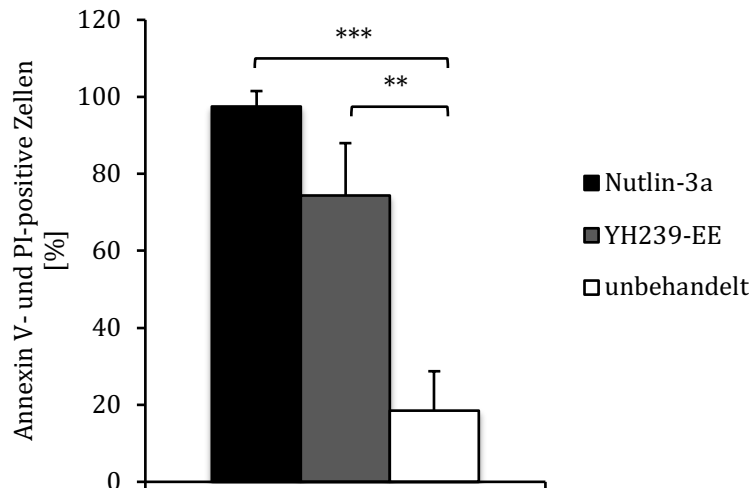


Abbildung 16: Induktion von Apoptose und Nekrose durch YH239-EE oder YH239.

(A): Inkubation der Zelllinien OCI-AML-3, MOLM-13, HL60 und NB4 für 72 h mit je 20 μ M Nutlin-3a, YH239-EE und YH239 und Bestimmung von apoptotischen (Annexin-positiv) und nekrotischen Zellen (PI-positiv) mittels Annexin V/PI-Färbung. Die Säulendiagramme zeigen die relative Induktion (fold induction) im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Mittelwerte wurden aus n=2 bis n=8 biologischen Replikaten gebildet, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

(B)



(B): MOLM-13-Zellen wurden über 72 h mit 20 μ M Nutlin-3a oder YH239-EE inkubiert und anschließend mit Annexin V und PI gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n = \text{min. } 4 - \text{max. } 8$) mit Standardabweichung als Fehlerbalken. Die Signifikanz der Unterschiede ist durch die p-Werte angegeben. $p^{**} < 0,01$ und $p^{***} < 0,001$.

Diese Versuche bestätigten, dass Nutlin-3a und YH239-EE bei einer Konzentration von 20 μ M effizient in den p53-wt-Zelllinien OCI-AML-3 und MOLM-13 Apoptose und Nekrose induzieren. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen stieg der Anteil dieser Zell-Population in OCI-AML-3-Zellen nach Behandlung mit Nutlin-3a um das 7,8-fache ($SD \pm 0,4$), mit YH239-EE um das 4,8-fache ($SD \pm 2,5$). In MOLM-13-Zellen bewirkte Nutlin-3a eine Steigerung der Apoptose um das 5,3-fache ($SD \pm 0,2$), YH239-EE um das 4,0-fache ($SD \pm 0,7$). Beide Substanzen zeigten keine Wirkung in p53-defizienten HL60-Zellen. Wie bereits vorher beobachtet (s. Tab. 5), erhöhte die Behandlung mit YH239-EE - nicht jedoch mit Nutlin-3a - den Anteil der apoptotischen bzw. nekrotischen NB4-Zellen um das 5,9-fache ($SD \pm 2,6$). Unter Nutlin-3a zeigte sich lediglich ein Anstieg um das 2,4-fache mit ($SD \pm 0,6$). Wie erwartet, zeigte YH239 auch in diesem Assay keinerlei Effekt. Im Mann-Whitney-U-Test wurde die Signifikanz der Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle berechnet. Sowohl Nutlin-3a als auch YH239-EE induzierten in MOLM-13 hoch signifikant den Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen (s. Abb. 16B).

3.3.2 Behandlung mit YH239-EE erhöht die SubG₁-Population in MOLM-13-Zellen nach 24 h

Für die Bestimmung der SubG₁-Population im Zellzyklusprofil wurde die Behandlungsdauer mit 20 µM Nutlin-3a, YH239-EE oder YH239 von 72 h auf 24 h reduziert.

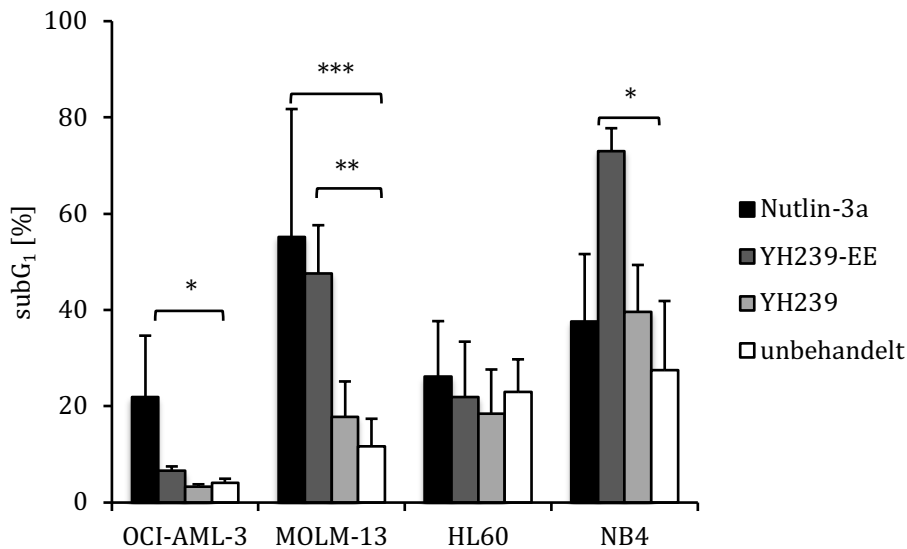


Abbildung 17: Bestimmung der SubG₁-Zellen nach Behandlung mit YH239-EE und YH239 über 24 h.

Die Zellen wurden über 24 h mit je 20 µM Nutlin-3a, YH239-EE oder YH239 behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Balkendiagramme zeigen SubG₁-Population (%) in den Zelllinien OCI-AML-3, MOLM-13, HL60 und NB4. Dargestellt sind die Mittelwerte (n= min. 2 - max. 11) mit Standardabweichung als Fehlerbalken. Der p-Wert ist für * < 0,05, ** < 0,01 und *** < 0,001.

Der statistisch signifikanteste Anstieg der SubG₁-Population wurde in MOLM-13-Zellen beobachtet, nämlich auf 47,7 % (SD ± 10,0 %) durch YH239-EE bzw. auf 55,2 % (SD ± 26,6 %) durch Nutlin-3a. Dieser Effekt war, anders als in der nach 72 h gemessenen Apoptoseinduktion (s. Abb. 16), in OCI-AML-3 Zellen schwächer. Nur die Behandlung mit Nutlin-3a (21,9 % bei SD ± 12,8 %) ergab in dieser Zelllinie einen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Die Erhöhung der SubG₁-Zellen durch YH239-EE war nicht signifikant (6,6 % bei SD ± 0,9 %). HL60-Zellen zeigten wiederholt keine Wirkung auf die getesteten Antagonisten, während ähnlich wie vorher gezeigt, YH239-EE moderat die SubG₁-Fraktion von NB4-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen erhöhte (s. Abb. 17).

3.3.3 YH239-EE reduziert konzentrationsabhängig die metabolische Aktivität/Proliferation von MOLM-13-Zellen

Das Risiko von Nebenwirkungen inhibitorischer Substanzen ist abhängig von der eingesetzten Konzentration. Dies wurde auch in der klinischen Phase I Studie des MDM2-Antagonisten RG7112 gezeigt (Andreeff *et al.*, 2016).

Daher wurden als nächstes die AML-Test-Zelllinien für 48 h mit 0,1, 0,5, 1, 5, 10 und 20 μ M YH239-EE inkubiert und die metabolische Aktivität bzw. Proliferation über den Umsatz von WST-1 analysiert. Wie aus Abbildung 18B hervorgeht, reduzierte YH239-EE ab 5 μ M die relative metabolische Aktivität in MOLM-13-Zellen von 100 % auf 76 %. Die Reduktion war ausgeprägter bei 10 und 20 μ M. Anders als erwartet, konnte in diesen Testreihen kein Einfluss von YH239-EE auf die metabolische Aktivität von OCI-AML-3-Zellen festgestellt werden. Paradoxerweise zeigte YH239-EE einen sehr starken Effekt in NB4-Zellen. Dies weist darauf hin, dass in dieser Zelllinie YH239-EE möglicherweise den Stoffwechsel auch über p53-unabhängige Prozesse beeinflusst. Andererseits konnte in der p53-defizienten Zelllinie HL60 die Wirkungslosigkeit von YH239-EE auf den Metabolismus in Abwesenheit von p53 bestätigt werden.

(A)

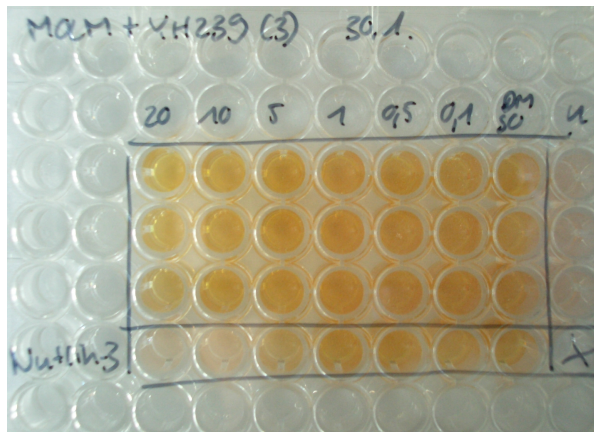
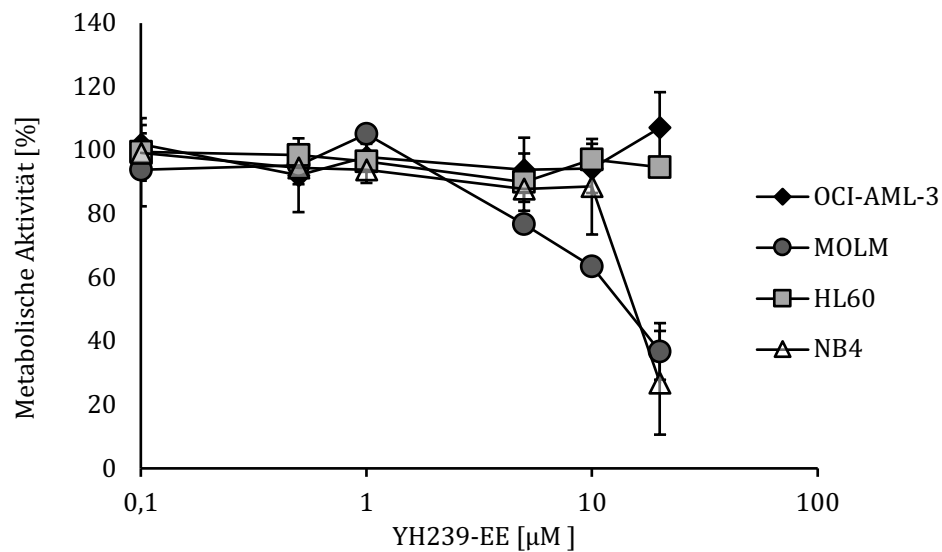


Abbildung 18: Konzentrationsabhängige Änderung der metabolischen Aktivität nach Inkubation mit YH239-EE

(A): Die metabolische Aktivität wurde anhand der Farb- bzw. Absorptionsänderung durch den konzentrationsabhängigen Umsatz von WST-1 zur Formazan gemessen. Gezeigt ist ein beispielhafter Versuchsaufbau mit MOLM-13-Zellen nach Behandlung mit YH239-EE (Triplikate) und Nutlin-3a im Vergleich.

(B)

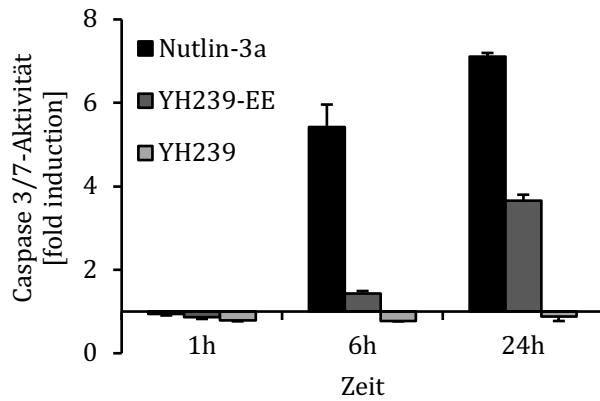


(B): Die metabolische Aktivität von OCI-AML-3-, MOLM-13-, HL60- und NB4-Zellen wurde nach 48-stündiger Inkubation mit 0,1, 0,5, 1, 5, 10 und 20 µM YH239-EE über den Umsatz von WST-1 analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=3), die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

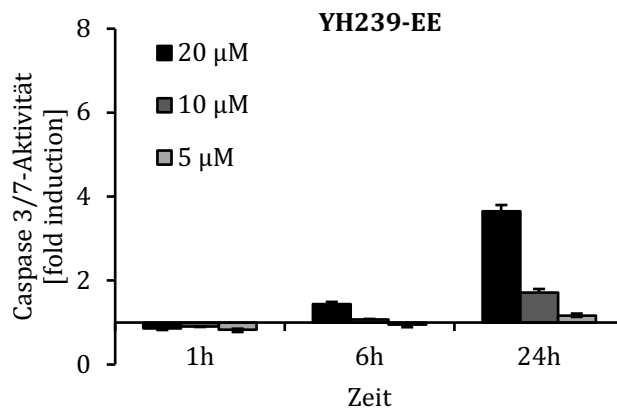
3.3.4 YH239-EE aktiviert die Effektorcaspasen 3 und 7

Um Informationen über die zur Apoptose führenden Signalwege zu erhalten, wurde die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7, Komponenten des extrinsischen Weges, mit Hilfe des Caspase-Glo 3/7 Assay Systems ermittelt. MOLM-13-Zellen wurden hierzu über 1, 6 und 24 h mit 5, 10 und 20 µM Nutlin-3a, YH239-EE oder YH239 inkubiert. Anschließend wurde luminometrisch indirekt über Aminoluciferin die Aktivität der Caspasen bestimmt. In Gegenwart von 20 µM Nutlin-3a war die Caspase-Aktivität bereits nach 6 h um das 5,4-fache erhöht, nach 24 h um das 7,1-fache (s. Abb. 19A). Zeitlich verzögert und moderater, erhöhte sich nach 24 h auch die Caspase-Aktivität in mit YH239-EE behandelten Zellen um das 3,7-fache. Erwartungsgemäß führte die Inkubation mit der Negativkontrolle YH239 zu keiner Aktivierung. Im Hinblick auf mögliche Nebenwirkungen durch hohe Konzentrationen von MDM2-Antagonisten, wurde anschließend die Aktivierung der Caspasen bei niedrigeren Konzentrationen untersucht. Während die Caspase-Aktivität nach 24 h bereits bei 5 µM Nutlin-3a deutlich um das 5,2-fache anstieg, waren für eine 3,7-fache Erhöhung der Aktivität 20 µM YH239-EE erforderlich. Geringere Konzentrationen erwiesen sich als wirkungslos (s. Abb. 19B und C).

(A)



(B)



(C)

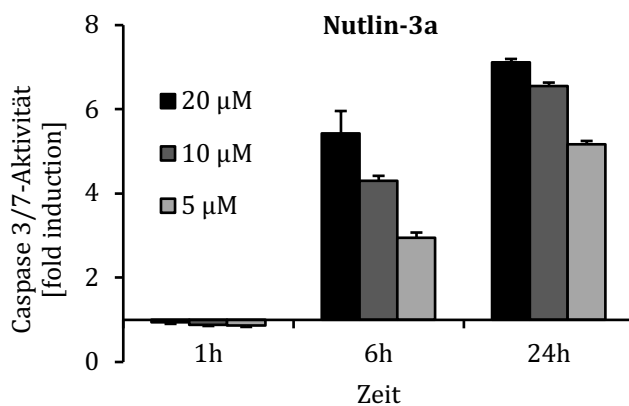


Abbildung 19: Aktivitätsmessung der Caspasen 3 und 7.

(A): Caspase 3/7-Aktivität in MOLM-13-Zellen nach 1, 6, und 24 h Inkubation mit 20 μ M Nutlin-3a, YH239-EE, oder YH239. (B): Caspase 3/7-Aktivität in MOLM-13-Zellen nach 1, 6 und 24 h Inkubation mit 20, 10 und 5 μ M YH239-EE bzw. (C) Nutlin-3a.

Alle Werte sind als n-facher Anstieg (fold induction) gegenüber unbehandelten Zellen dargestellt. Die Säulendiagramme zeigen die Mittelwerte (n=3), die Fehlerbalken die Standardabweichung.

3.3.5 Analyse weiterer potentieller MDM2-Antagonisten

Neben den in Tabelle 1 aufgelisteten „small molecules“ #1-#5 wurden 20 weitere Substanzen getestet, darunter auch neue Ester-Säure-Paare. Mit jeder der Substanzen wurden MOLM-13-Zellen behandelt und der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Färbung mit Annexin V und PI analysiert. Diejenigen Substanzen, die nach 72-stündiger Inkubation in MOLM-13-Zellen am stärksten Apoptose und Nekrose induziert hatten, wurden anschließend auf ihre Fähigkeit Caspasen zu aktivieren untersucht. Darüber hinaus wurden in den entsprechenden Zellen Zellzyklusprofile und metabolische Aktivität untersucht. Die Einzeldaten sind in Tabelle 8 (s. Kapitel 8.1) zusammengefasst und werden in dieser Arbeit nicht weiter diskutiert.

3.4 Analyse der (-) und (+) Enantiomere von YH239-EE

Chemisch synthetisiertes YH239-EE liegt als Enantiomer-Gemisch vor. Oftmals besitzt nur ein Enantiomer die gewünschten biologischen Eigenschaften. Abbildung 20 zeigt die chemische Struktur von YH239-EE mit seinem Stereozentrum, welches die räumliche Anordnung der Substituenten bestimmt. Das Gemisch wurde mittels präparativer chiraler SFC (Superkritische Fluid Chromatographie) in die Enantiomere YH239-EE (-) und YH239-EE (+) getrennt (Huang *et al.*, 2014) und die gereinigten Enantiomere auf ihre biologische Aktivität getestet. Im Einzelnen wurden die Wirksamkeit hinsichtlich Induktion der Apoptose, Änderung des Zellmetabolismus sowie Aktivierung der Caspase 3/7-Aktivität verglichen.

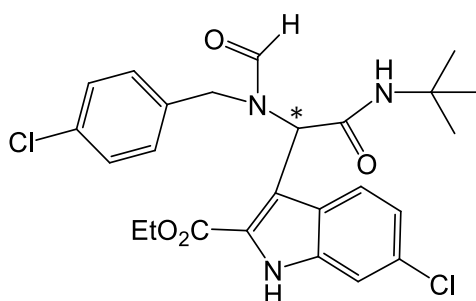


Abbildung 20: Struktur (asymmetrisches C-Atom) und Stereozentrum von YH239-EE (Stern).

3.4.1 Starke Induktion von Apoptose durch YH239-EE (+)

MOLM-13 Zellen wurden für 72 h mit 20 μ M der (-) und (+) Enantiomere von YH239-EE bzw. Nutlin-3a als Referenz inkubiert und die Induktion der Apoptose über Annexin V/PI-Färbung bestimmt.

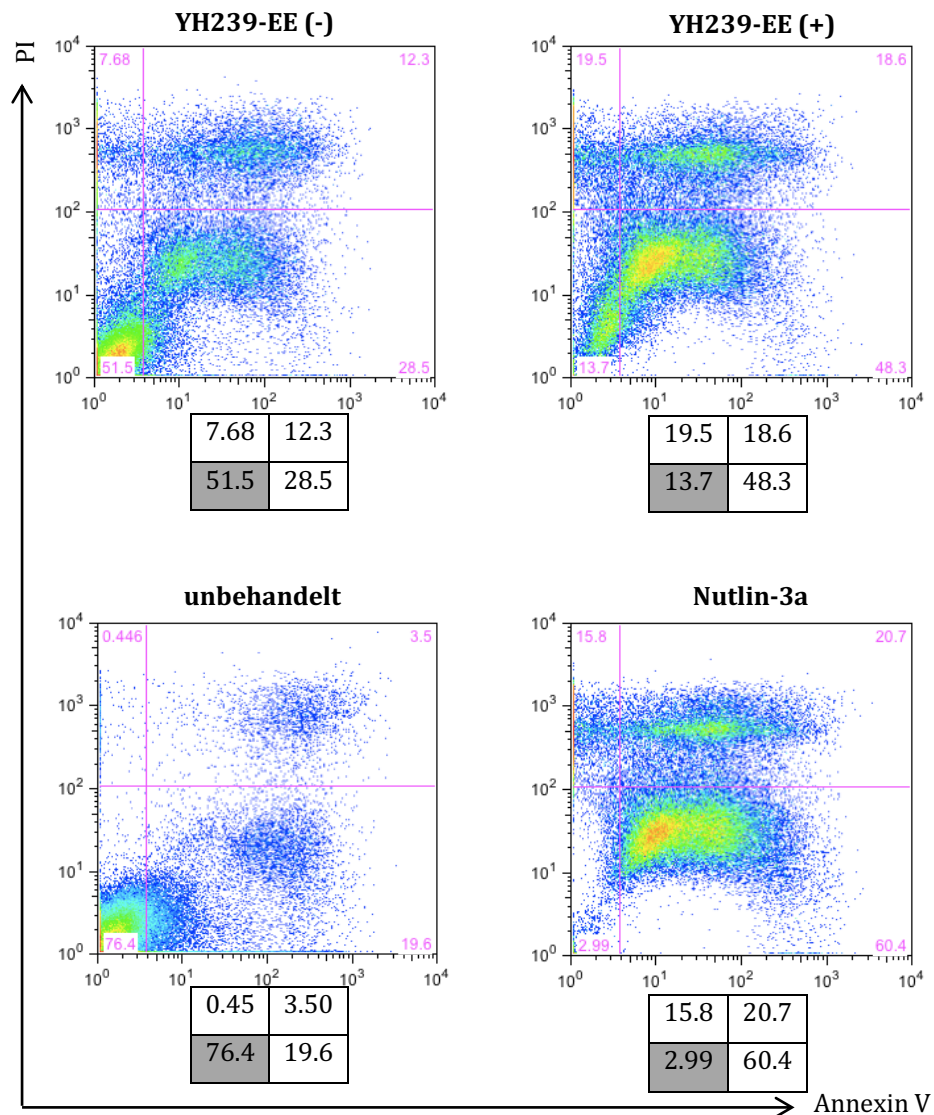


Abbildung 21: Apoptoseinduktion durch die Enantiomere YH239-EE (-) und YH239-EE (+).

MOLM-13-Zellen wurden für 72 h mit je 20 μ M YH239-EE (-), YH239-EE (+) oder Nutlin-3a behandelt und mittels Annexin V/PI-Färbung der Anteil apoptotischer (Annexin-positiv) bzw. nekrotischer Zellen (PI-positiv) bestimmt. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Zahlen unter den Dot Plots zeigen die Quantifizierung der FACS-Signale in den betreffenden Quadranten.

Wie aus den Dot Plots und der Quantifizierung der einzelnen Quadranten ersichtlich, war das YH239-EE (+) Enantiomer der bessere Induktor für Apoptose verglichen mit YH239-EE (-). Nach Behandlung war der Anteil früh-/spät-apoptotischer sowie nekrotischer Zellen deutlich auf 86,4 % erhöht und erreichte damit Werte, die nur knapp 10 % unter der Wirksamkeit des etablierten MDM2-

Antagonisten Nutlin-3a (96,9 %) lagen (s. Abb. 21). Durch YH239-EE (-) wurden weit weniger apoptotische Zellen generiert, nämlich 48,5 %; mehr als die Hälfte der Zellen (51,5 %) war weiterhin vital.

3.4.2 Der Zell-Metabolismus wird stärker durch YH239-EE (+) als durch YH239-EE (-) reduziert

Um die stärkere Apoptose-induzierende Wirkung von YH239-EE (+) zu verifizieren, wurde der Umsatz von WST-1 zu Formazan als Parameter für den zellulären Metabolismus ermittelt. MOLM-13-Zellen wurden über 48 h mit verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 50 μM des (-) und (+) Enantiomers von YH239-EE, Nutlin-3a bzw. der biologisch inerten Substanz YH239 behandelt. Die Analyse zeigte eindeutig, dass YH239-EE (+) sehr effizient und sogar besser als Nutlin-3a den Umsatz von WST-1 reduzierte (s. Abb. 22). Dies geht auch aus dem entsprechenden IC_{50} -Wert hervor, der mit 13,14 μM für YH239-EE (+) unter dem IC_{50} -Wert von 21,65 μM für YH239-EE (-) lag.

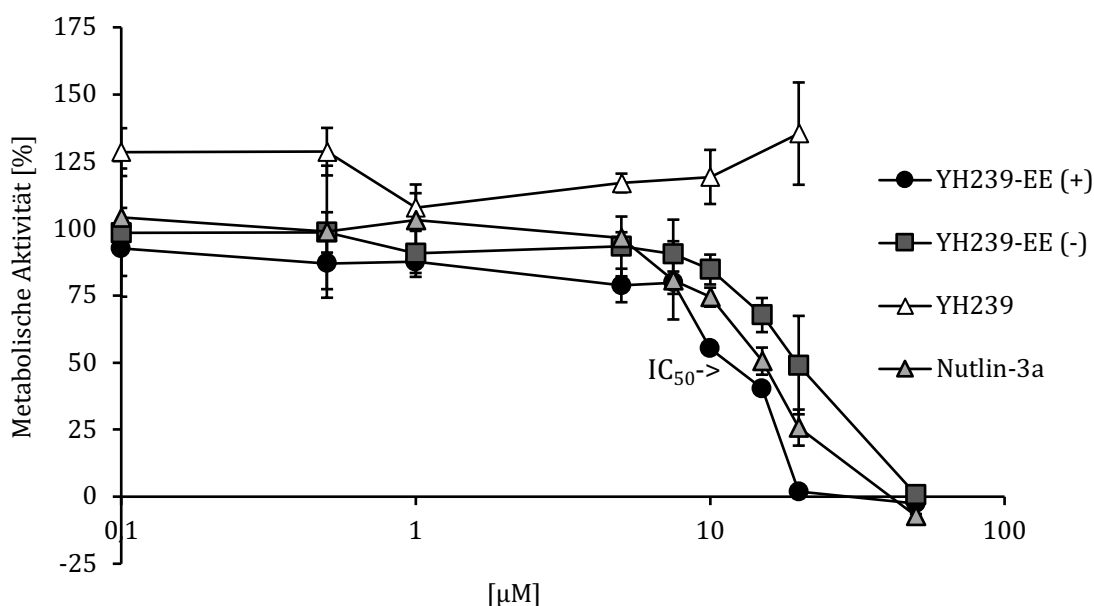


Abbildung 22: Vergleich der Wirksamkeit von YH239-EE (-) und YH239-EE (+) auf Zellproliferation und -metabolismus.

MOLM-13-Zellen wurden mit Nutlin-3a, YH239-EE (-) und YH239-EE (+) in aufsteigender Konzentration (0,1, 0,5, 1, 5, 7,5, 10, 15, 10, 50 μM) über 48 h inkubiert und die zelluläre Stoffwechselaktivität über Umsatz von WST-1 ermittelt. Als Negativkontrolle diente YH239. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=3), die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

3.4.3 YH239-EE (+) erhöht die Caspase 3/7-Aktivität

Zusätzlich wurden die YH239-EE-Enantiomere auf ihr Potential, die Caspasen 3 und 7 zu aktivieren, überprüft. Nach 1-, 6- und 24-stündiger Behandlung mit 20 μ M YH239-EE (-) bzw. YH239-EE (+) wurde die Caspase-Aktivität indirekt mit dem Caspase Glow 3/7-Assay luminometrisch gemessen. Die Resultate in Abbildung 23 zeigen, dass sich nach 24-stündiger Inkubation mit dem (+) Enantiomer die Caspase-Aktivität um das 3,8-fache erhöhte, durch das (-) Enantiomer hingegen nur um das 2,2-fache. Diese Werte stehen in Einklang mit den übrigen Ergebnissen und belegen, dass YH239-EE (+) das aktivere Enantiomer von YH239-EE darstellt.

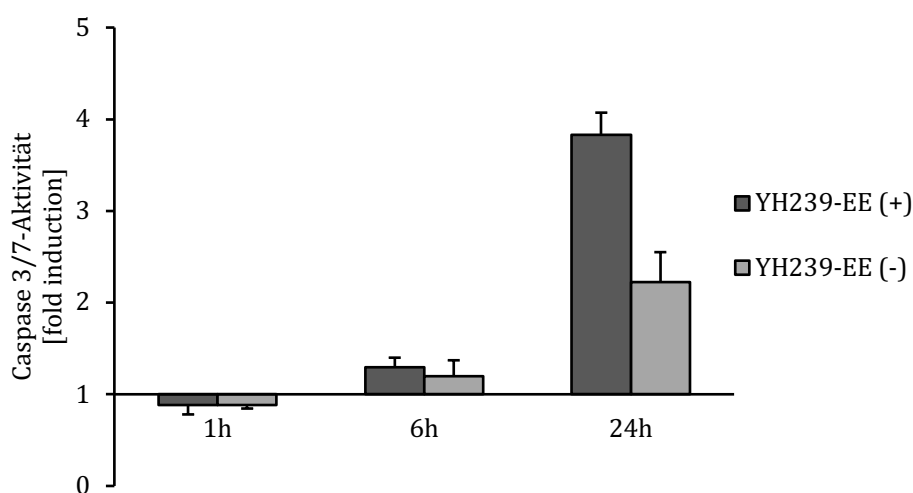


Abbildung 23: Induktion von Effektorcaspasen durch YH239-EE (+).

Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in MOLM-13-Zellen wurde 1, 6 und 24 h nach Behandlung mit je 20 μ M YH239-EE (-) und YH239-EE (+) luminometrisch ermittelt. Die Balkendiagramme zeigen die relative n-fache Änderung (fold induction) gegenüber unbehandelten Zellen (Wert = 1) aus drei biologischen Replikaten (n=3) mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

3.4.4 Überexpression von p21 durch YH239-EE (+)

P53 induziert nach Aktivierung die Expression wichtiger Zellzyklus- und Apoptose-Regulatoren, unter anderem von p21. Stellvertretend für das Verhalten proapoptotischer Moleküle wurde im Folgenden versucht, die Akkumulation von p21 zu beweisen. Der 21 kD große CDK-Inhibitor führt p53-abhängig zum Zellzyklusarrest (Gartel, 2006). Als geeignetes Verfahren für die Detektion dieses Proteins wurde der Western Blot gewählt. Zellen der p53-wt-Zelllinien OCI-AML-3 und MOLM-13 wurden für 2, 8 und 12 h mit 20 μ M Nutlin-3a oder YH239-EE inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteine durch

Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Nach dem Blotten erfolgte die Beschichtung der Membranen mit einem p21-Antikörper. Abbildung 24 entstand nach einer Belichtungszeit von 60 Sekunden.

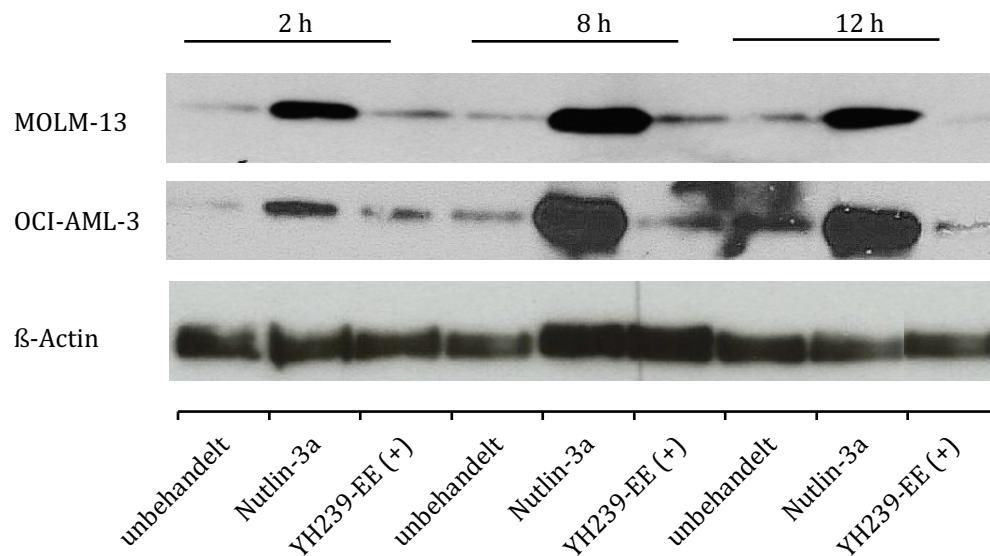


Abbildung 24 : P21-Detektion im Western Blot.

Expression des proapoptotischen Proteins p21 in Zellen der Linien MOLM-13 und OCI-AML-3, die mit 20 μ M Nutlin-3a und YH239-EE (+) über 2, 8 und 12 inkubiert wurden. Die Ladekontrolle erfolgte mit β -Actin.

Nutlin-3a führte schon nach 2 h zu einer Expressionssteigerung von p21, sowohl in den in den MOLM-13- als auch in den OCI-AML-3-Zellen, mit einer Zunahme der Bandenintensität nach 8 und 12 h. YH239-EE (+) bewirkte nach 8 h Inkubation eine Zunahme der p21-Expression in MOLM-13-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach 12 h konnte keine weitere Expressionssteigerung gezeigt werden. OCI-AML-3-Zellen zeigten bereits nach 2 h ein stärkeres p21-Signal, welches im Verlauf jedoch keinen deutlichen Unterschied mehr zur unbehandelten Kontrolle zeigte.

3.5 Patienten-abhängige Induktion von Apoptose durch YH239-EE (+)

In den vorherigen Testreihen wurde die biologische Aktivität von YH239-EE in etablierten und gut charakterisierten AML-Zelllinien untersucht. Im Hinblick auf eine potentielle Weiterentwicklung zu einem Chemotherapeutikum ist es von hoher Priorität, die Wirksamkeit von YH239-EE auch in primären AML-Blasten zu testen (Christner *et al.*). Hierfür stand Probenmaterial von 8 Patienten mit der

Erstdiagnose AML zur Verfügung. Es handelte sich um Knochenmarkspunktate (BM) aus 7 Patienten, sowie der Blutprobe (PBMC) eines Patienten. In Tabelle 7 sind einige zyto- und molekulargenetische Charakteristika der Blasten dieser 8 Patienten zusammengefasst. Der p53-Status wurde nur in den Patienten # 4 und # 5 ermittelt. Hier konnte p53-wt nachgewiesen werden. Vier der Patienten wiesen die häufig beschriebenen Mutationen im *NPM1*- und *FLT3*- Locus, teils alleine (#1 und #5), teils in Kombination (# 3 und # 4) auf. Im Allgemeinen gilt die Prognose für *NPM1*-Mutationen günstig, nicht jedoch für *FLT3-ITD* (Kottaridis *et al.*, 2001).

Patient	Alter (Jahre)	Probenmaterial	Karyotyp	Blasten (%)	Mutationen		
					<i>TP53</i>	<i>NPM1</i>	<i>FLT3-ITD</i>
# 1	43	BM	46,XY (25)	83	nd	+	nd
# 2	61	BM	46,XX	79	nd	nd	nd
# 3	79	BM	48,XY,+4,+8 (20)	90	nd	+	+
# 4	49	BM	46,XY (10)	70	wt	+	+
# 5	76	BM	46, XX t (3;21)	85	wt	nd	+
# 6	57	BM	46,XX	41	nd	nd	nd
# 7	70	PB	45,XY / 46,XY	45	nd	nd	nd
# 8	68	BM	46,XY	35	nd	nd	nd

Tabelle 7: Zyto- und molekulargenetische Charakteristika der primären Blasten aus AML-Patienten.

Für die Analyse wurde Probenmaterial von 8 AML Patienten verwendet. Die Tabelle zeigt das Alter der Patienten, den Ursprung des Probenmaterials, den Karyotyp, den Anteil der Blasten, sowie den Status für p53, NPM1 und FLT3. BM: Bone marrow; ITD: internal tandem duplication, nd: not determined; PB: peripheres Blut.

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der Patientenproben wurde die Apoptose-induzierende Wirksamkeit von YH239-EE (+) auf Blasten der AML-Patienten lediglich über Annexin V/PI-Färbung bestimmt. Hierzu wurden die Blasten zunächst auf eine Zellschicht aus Maus-Fibroblasten ausgesät, um das Wachstum zu stimulieren. Nach Behandlung der Zellen mit 20 µM YH239-EE (+) über 72 h, analog zum Protokoll für AML-Zelllinien, erfolgte die Färbung mit Annexin V/PI. Die Resultate der durchflusszytometrischen Messung sind in Abbildung 25 zusammengefasst und zeigen die relative Erhöhung des Anteils aller apoptotischen und nekrotischen Zellen im Verhältnis zu den unbehandelten Blasten.

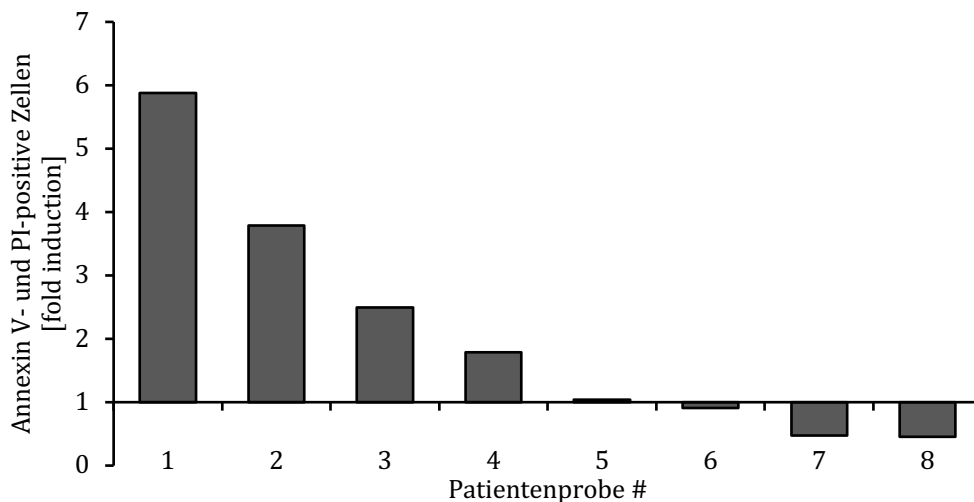


Abbildung 25: Apoptoseinduktion durch YH239-EE (+) in primären Blasten aus 8 AML-Patienten.

Der Anteil apoptotischer Blasten nach Behandlung mit 20 μ M YH239-EE (+) über 72 h wurde nach Annexin V/PI-Färbung ermittelt. Die Balkendiagramme zeigen die relative n-fache Änderung des apoptotischen (Annexin-positiv) und nekrotischen (PI-positiv) Zellanteils nach Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Wert=1).

In diesem ersten Vorversuch wurde in den Patientenproben # 1-4 eine Zunahme apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Behandlung mit YH239-EE (+) beobachtet (s. Abb. 25). Auffällig ist, dass diese Patienten einen hohen Blastenanteil von 83 % (# 1), 79 % (# 2), 90 % (# 3), bzw. 70 % (# 4) aufwiesen (s. Tab. 7). Die Blasten von Patient # 1 sprachen am besten auf die Behandlung mit dem neuen MDM2-Antagonisten an, während bei Patienten # 5 - # 8 kein YH239-EE (+) - induzierter Anstieg der Apoptose zu verzeichnen war.

Exemplarisch sind in Abbildung 26 die Messergebnisse der Patientenprobe # 4 detaillierter dargestellt. Aus den Dot Plots der Durchflusszytometrie geht der Anstieg apoptotischer Zellen nach Behandlung mit YH239-EE (+) deutlich hervor. Inkubation mit YH239-EE (+) induzierte einen Anstieg des Anteils der apoptotischen und nekrotischen Zellen von 47,42 % auf 85,32 %. In dieser ersten Testreihe war leider nicht für alle Patientenproben der Status der wichtigsten Mutationen, insbesondere von p53, bekannt. Dies und die fehlenden Replikate erschweren daher die Interpretation des Resultats.

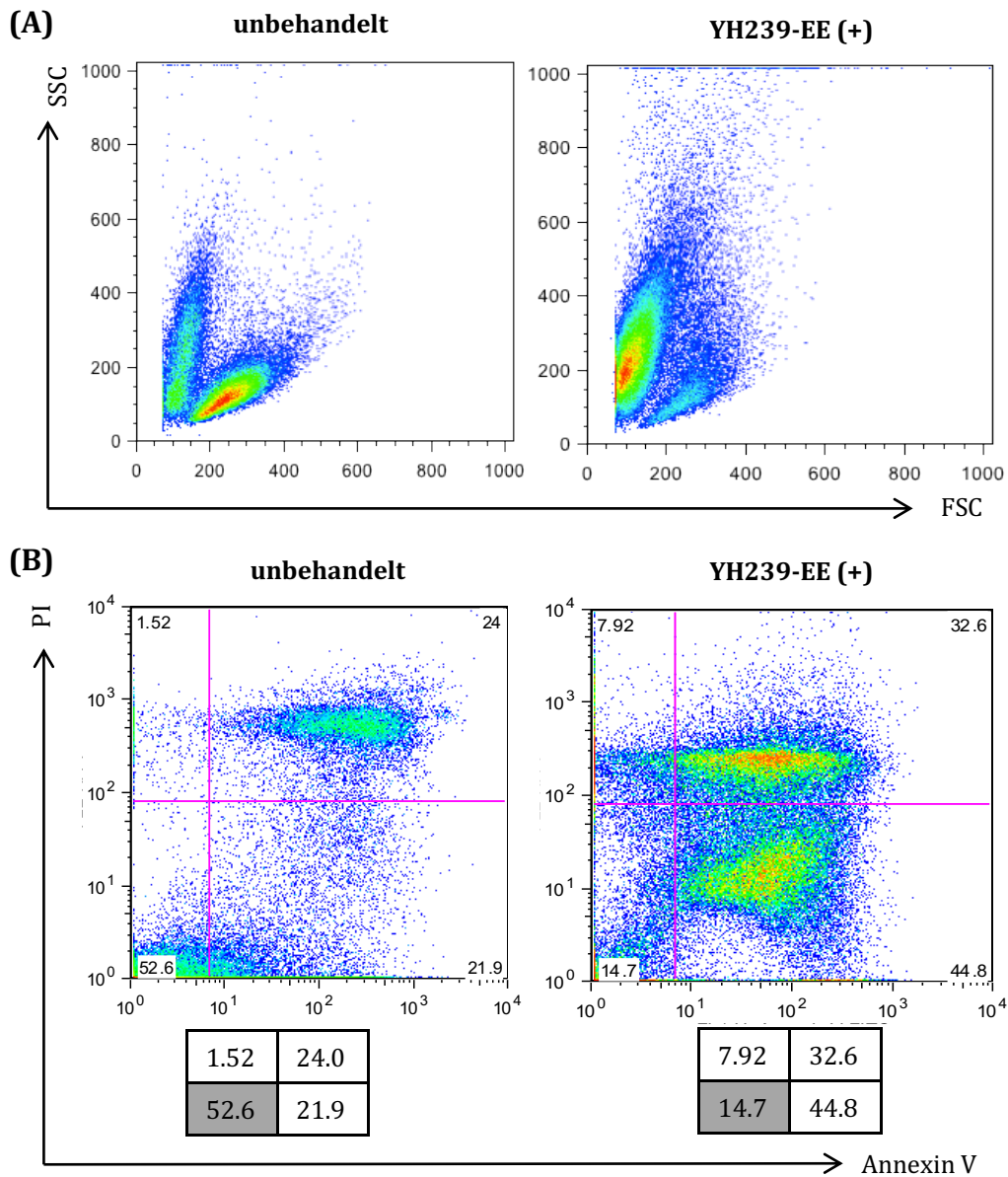


Abbildung 26: Annexin V/PI-Färbung von Patientenprobe # 4 nach 72 h.

Durchflusszytometrische Analyse der über 72 h mit YH239-EE (+) inkubierten AML-Blasten von Patient # 4 (rechte Spalte) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (linke Spalte). (A) zeigt die FSC/SSC-Werte, (B) die Dot Plots nach Färbung mit Annexin V und PI.

Die Behandlung der primären Blasten mit YH239-EE (+) erscheint ansatzweise als vielversprechend. Die vorläufigen Ergebnisse müssen jedoch durch weitere, umfangreiche Tests erhärtet werden.

4 Zusammenfassung

Da p53 in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor entscheidend an der Regulierung von Zellzyklus und Apoptose beteiligt ist, ist die Deaktivierung von p53 für die Tumorentstehung und Tumorprogression von hoher Bedeutung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass über die Kenntnis der Interaktionsdomäne von p53 mit seinem Inhibitor MDM2, insbesondere der für die Interaktion essentiellen Aminosäuren, mittels Fragment-basiertem Design neue Antagonisten entworfen werden können, die in der Lage sind, die Interaktion zwischen beiden Moleküle zu stören und p53 zu reaktivieren.

Nach Etablierung der Methoden anhand des validierten MDM2-Antagonisten Nutlin-3a, wurde die biologische Wirksamkeit von fünf nach oben stehender Methode neu synthetisierten Antagonisten zunächst auf die Apoptose und schließlich auf den Zellzyklus vier verschiedener AML-Zelllinien mit unterschiedlichem *TP53*-Status untersucht. Als effektivste Substanz erwies sich YH239-EE, deren Strukturformel eine Ethylestergruppe besitzt und sich dadurch von den übrigen Antagonisten unterscheidet. Daher wurde YH239-EE im Folgenden genauer untersucht. Die Substanz führte in den p53-wt-Zelllinien bereits nach 24 h zu einem Anstieg der SubG₁-Population im Zellzyklus als Zeichen einer vermehrten Apoptoseaktivität der Zellen. Darüber hinaus wurde eine Reduktion der Zellproliferation über den Umsatz von WST-1 gemessen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass YH239-EE die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 als Komponenten des extrinsischen Apoptose-Signalwegs erhöht. Durch Färbung mit Annexin und PI wurden nach 72 h Inkubation mit YH239-EE apoptotische und nekrotische Zellen markiert und ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen.

Nach chromatographischer Trennung der Enantiomere erwies sich in vergleichbaren Versuchsreihen YH239-EE (+) als aktivere Form. Des Weiteren lies sich eine Expressionssteigerung des p53-abhängigen und proapoptotischen Moleküls p21 durch YH239-EE (+) nachweisen. Im letzten Teil der Arbeit erfolgte eine Testung dieses potentiellen MDM2-Antagonisten auf Primärmaterial von Patienten mit der Erstdiagnose AML. Hier zeigte YH239-EE (+) nach Annexin V/PI-Färbung eine Zunahme apoptotischer und nekrotischer Zellen in 4 von 8 Patienten. Somit steht mit YH239-EE (+) ein vielversprechender MDM2-Antagonist für fortführende Versuchsreihen zur Verfügung.

5 Diskussion

5.1 YH239-EE (+)- Neuer Hoffnungsträger?

Sowohl in der industriellen als auch in der akademischen Forschung bildet die Interaktion von MDM2 mit p53 ein attraktives Ziel, um neue Chemotherapeutika nicht nur für die Behandlung der AML zu entwickeln. Der Antagonist Nutlin-3a von Roche gehört zu den gegenwärtig erfolgreichsten MDM2-Inhibitoren, ist jedoch noch nicht für den klinischen Gebrauch zugelassen. Ähnlich wie die in dieser Arbeit untersuchten YH-Moleküle, entwickelten auch die Firmen Novartis, Nexuspharma sowie Johnson & Johnson MDM2-Inhibitoren durch Multikomponenten-Reaktionen (Khoury *et al.*, 2011). Der in Kapitel 1.2.3 beschriebene Indol-Anker war auch Vorlage für Forscher der University of Michigan und die Firma Cancer Research Technology Limited (Ding *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass trotz der im vorangehenden Abschnitt beschriebenen großen Anzahl potentieller MDM2-Antagonisten bisher keiner für die Behandlung der AML zugelassen wurde, verlangt nach Alternativen.

YH239-EE erwies sich bereits im ersten Screening der Testsubstanzen auf ihre biologische Aktivität hin als vielversprechendes Molekül. Weder die Verbindung YH239, noch YH216, YH230 oder YH283 zeigten Effekte, die mit denen von Nutlin-3a vergleichbar waren. Im Vergleich der Strukturformeln der fünf neuen Testsubstanzen ist auffallend, dass nur YH239-EE eine Ethylester-Seitengruppe besitzt. Diese Eigenschaft des Moleküls könnte mit einer besseren Aufnahme in die Zelle verbunden sein. Die Substanzen #2-#5 besitzen an derselben Stelle eine Carboxylsäure als Substituent. Dadurch befinden sie sich im physiologischen Milieu in einem geladenen Zustand, was die Absorption erschweren könnte. Nach jetzigem Kenntnisstand kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass YH239-EE eine Vorstufe repräsentiert, von der intrazellulär die Ethylester-Gruppe abgespalten wird und dadurch das Molekül YH239 entsteht, welches dann als eigentlicher MDM2-Antagonist fungiert (Huang *et al.*, 2014).

Unter YH239-EE stieg der Anteil der Annexin V- und PI-positiven p53-MOLM-Zellen (p53-wt) nach 72 h auf 84,9 %. Bei den OCI-AML-3-Zellen (p53-wt) lag dieser Anteil mit 85,2 % sogar höher als nach einer Inkubation mit Nutlin-3a (81,4 %). Vergleichbare Ergebnisse schienen sich zunächst auch in der Zellzyklusanalyse zu präsentieren, in der YH239-EE zu einem Anteil von 48,8 % MOLM-13-Zellen in

der SubG₁-Phase führte. Überraschenderweise konnten weder die Inkubation mit YH239-EE, noch mit Nutlin-3a die Zellzahl der ebenfalls p53-wt-Zelllinie OCI-AML-3 in der SubG₁-Phase über 40 % steigern. Dieses Ergebnis bestätigte sich auch im direkten Vergleich von YH239-EE und YH239. Nur MOLM-13-Zellen zeigten sowohl nach Inkubation mit YH239-EE, als auch Nutlin-3a einen signifikanten Anstieg des SubG₁-Anteils nach 24 h. Auch bei der Messung der metabolischen Aktivität in den OCI-AML-3-Zellen nach 48 h bewirkte YH239-EE erneut nicht den erwarteten Effekt in einer wt-p53-Zelllinie. Die OCI-AML-3-Zelllinie verhielt sich hier ähnlich wie die Kontrollzelllinie HL60 und zeigte keine Reduktion des Zellmetabolismus. Möglicherweise liegt die Ursache für dieses Verhalten in einer mit 24 h zu kurzen Inkubationszeit mit dem potentiellen MDM2-Antagonisten. So nahm in dieser Versuchsreihe der Anteil von Annexin V- und PI-positiven OCI-AML-3 Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit YH239-EE bzw. Nutlin-3a im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um wieder das 4,8 bzw. 7,8-fache zu. Auch die Effekte von YH239-EE auf NB4-Zellen (*TP53*-mutiert) waren in dieser Arbeit anders als erwartet, diese Beobachtung wird im folgenden Kapitel gesondert diskutiert.

YH239-EE präsentierte sich jedoch in weiteren Versuchsreihen als konstant wirksamer MDM2-Inhibitor in MOLM-13-Zellen, so auch bei der Messung der metabolischen Aktivität oder bei der Analyse der Effektorcaspasen 3/7 als downstream targets von p53. Nach der Identifizierung des aktiveren Enantiomers YH239-EE (+) gelang nicht nur, wie in dieser Arbeit mittels Western Blot gezeigt, der Nachweis des proapoptotischen Proteins p21. Huang *et al.* wiesen in der Folge auch die Expressionssteigerung von MDM2 nach Inkubation von MOLM-13-Zellen mit YH239-EE (+) nach (Huang *et al.*, 2014). Bei der Untersuchung von YH239-EE (+) auf AML-Blasten konnte in 4 von 8 Proben eine deutliche Zunahme von Annexin V - und PI-positiven Zellen verzeichnet werden. Verglichen mit den Patientencharakteristika fällt auf, dass sich diese Patienten durch einen Blastenanteil $\geq 70\%$ auszeichnen. In Anbetracht der schlechten Prognose dieses Patientenkollektivs lässt das Ergebnis hoffen. Für eine genauere Aussage müssen allerdings mehr Patientenproben analysiert und mit spezifischen Patientencharakteristika verglichen werden.

5.2 Neue Phänomene oder alte Fehler?

Bei der Auswahl der Methoden orientierte sich diese Arbeit an Kojima *et al.* (Kojima *et al.*, 2005). Die Zelllinie NB4 (*TP53*-mutiert) präsentierte sich im Rahmen der Versuchsreihen mit Nutlin-3a und der neuen MDM2-Antagonisten unerwartet als ungeeignete Negativkontrolle. Bereits in den Vorversuchen kam es nach Inkubation mit Nutlin-3a zu einer unerwarteten Wachstumshemmung der Zellen. Auch die Zellzyklusanalyse zeigte nach 24 h einen großen Anteil an NB4-Zellen in der subG₁-Phase. Allerdings präsentierte sich die Zelllinie in den anschließenden Analysen des Zellmetabolismus und der Induktion der Apoptose nach Inkubation mit Nutlin-3a wieder vergleichbar mit HL60 Zellen. Nach Behandlung mit dem neuen MDM2-Antagonisten YH239-EE zeigten NB4-Zellen einen mit OCI-AML-3- und MOLM-13-Zellen vergleichbar hohen Anstieg sowohl der Annexin V- und PI-positiven Zellen als auch der Zellen in der subG₁-Phase der Zellzyklusanalyse.

Gründe für dieses Verhalten könnten einerseits darin liegen, dass für diese Zelllinie die Inkubationszeit mit den Testsubstanzen zu kurz war. Obwohl laut DSMZ die Verdopplungszeit identisch mit derjenigen von OCI-AML-3 ist, zeichneten sich die NB4-Zellen in den hier dargestellten Versuchen stets durch ein langsames Wachstum aus. Andererseits stammt NB4 nicht wie die restlichen drei Zelllinien von der AML, sondern der Promyelozytischen Leukämie (APL) ab. Darüberhinaus liegt die Vermutung nahe, dass YH239-EE (+), ähnlich wie für Nutlin-3a gezeigt (Zauli *et al.*, 2012), auch über p53-unabhängige Eigenschaften verfügt, die schlussendlich zum Zelluntergang führen. Für künftige Versuchsreihen sollte der Einsatz der Zelllinie NB4 überdacht und ggf. durch eine andere Zelllinie mit mutiertem *TP53*-Status ersetzt werden.

Als weitere Besonderheit fiel bei der Zellzyklusanalyse in Kapitel 3.2.2 nach Inkubation mit YH239, YH216 und YH230 eine doppelgipflige G₀/G₁-Phase auf, die in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde. Da es bei der Vorbereitung der Zellen für die durchflusszytometrische Messung zur Verklumpung der Zellen kommen kann, ist diese Methode störanfällig. Die übrigen Testsubstanzen. Nutlin-3a, YH239-EE und YH283 zeigten jedoch im selben Versuch eine regelrechte Darstellung der Zellzyklusphasen. In weiteren, hier nicht aufgeführten Versuchsreihen, wurde einer Verklumpung mit speziellen Filtern vorgebeugt, ohne dabei eine Veränderung zu beobachten. Somit bleibt die Frage, ob es sich bei

diesem Phänomen um die Variation eines G₀/G₁-Blocks handelt und als Zeichen einer vitalen Zellpopulation zu werten ist oder ob dieser Effekt auf die neuen MDM2-Antagonisten zurückzuführen ist, unbeantwortet.

5.3 YH239-EE (+) – ein Antagonist für Kombinationstherapien?

Da die AML, wie bereits in der Einleitung beschrieben, vorwiegend eine Erkrankung des höheren Alters darstellt, die Therapiemöglichkeiten für ältere Patienten jedoch limitiert sind, bedarf es neuer Therapie-Konzepte im Kampf gegen diese Erkrankung (Burnett *et al.*, 2011). Im Hinblick auf einen möglichen Selektionsdruck für p53-Mutationen durch Therapien, die sich gegen den p53-Regulator MDM2 richten, sind darüber hinaus neue Konzepte erforderlich, um potentielle p53-MDM2-Antagonisten wirkungsvoll einzusetzen. Nutlin-3a hatte in ersten klinischen Studien starke Nebenwirkungen auf den Magen-Darm-Trakt, die sich u.a. durch Übelkeit und Erbrechen äußerten (Andreeff *et al.*, 2016).

Über mögliche Nebenwirkungen von YH239-EE (+) lassen sich zu diesem Zeitpunkt noch keine Aussage treffen, da diese Substanz ausschließlich *in vitro* getestet wurde. YH239-EE (+) reduzierte jedoch beispielsweise bereits ab einer Konzentration von 5 µM den Zellmetabolismus erheblich. Um die Wirksamkeit zu steigern ohne potentielle Nebenwirkungen zu verstärken sind Kombinationstherapien denkbar. Erste Versuche wurden bereits mit Nutlin-3 und Valproinsäure (VPA) unternommen. VPA inhibiert Histon-Deacetylasen, was p53 stabilisieren könnte. McCormack *et al.* zeigten *in vitro* und *in vivo*, dass eine Kombinationstherapie mit Nutlin-3 und VPA zu einer signifikant verminderten Zellvitalität von MOLM-13-Zellen und primären AML-Blasten führt. Nutlin-3 war dabei mit einer Konzentration von nur 5 µM ausreichend dosiert (McCormack *et al.*, 2012). Erste Versuche mit YH239-EE und VPA wurden auch im Rahmen dieser Arbeit unternommen, scheiterten jedoch vorerst an der Löslichkeit von VPA. Zauli *et al.* unternahmen Versuche mit dem Proteinkinaseinhibitor Sorafinib, der in Kombination mit Nutlin-3 zu einer gesteigerten Zytotoxizität u.a. in FLT3-ITD-positiven AML-Zelllinien und AML-Blasten führte (Zauli *et al.*, 2012). Bei den in dieser Arbeit verwendeten und auf YH239-EE (+) ansprechenden Patientenproben sind #3-#4 ebenfalls positiv für FLT3-ITD. Somit könnte eine Kombination aus Sorafinib und YH239-EE (+) eine neue therapeutische Perspektive eröffnen.

5.4 MDM2/MDMX-Antagonisten

Für weitere Kombinationen bieten sich MDMX-Antagonisten an. MDMX, auch bekannt als MDM4, wurde erstmals von Shvarts *et al.* beschrieben und ist ein, u.a. in Bezug auf die Interaktionsstelle mit p53, strukturell mit MDM2 verwandtes Protein. So bindet es ähnlich wie MDM2, an die N-terminale Transaktivierungsdomäne von p53 und reguliert damit dessen Aktivität (Shvarts *et al.*, 1996). Die genauen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind bis heute nicht gänzlich verstanden und offenbar stark abhängig vom Gewebe- bzw. Zelltyp (Marine, Dyer, & Jochemsen, 2007). Neuere Daten weisen darauf hin, dass MDMX einen heterodimeren Komplex mit MDM2 bildet und in seiner E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität stärkt (de Graaf, Little, Ramos, Meulmeester, Letteboer, & Jochemsen, 2003). Beobachtungen von Wade *et al.* zeigen darüber hinaus, dass p53-MDM2-Inhibitoren in Tumoren, die statt MDM2 MDMX überexprimieren, weniger effektiv sind (Wade, Wong, Tang, Stommel, & Wahl, 2006). Daher könnte der Einsatz von MDM2/MDMX-Antagonisten zukünftig unumgänglich sein, da sie möglicherweise effizienter sind, als MDM2-Antagonisten alleine (Graves *et al.*, 2012). Obwohl sich MDM2 und MDMX in ihrem Grundaufbau ähneln, gibt es strukturelle Unterschiede, die es den bekannten p53-MDM2-Antagonisten bisher unmöglich machten beide Moleküle zu binden und inaktivieren. Nach ersten Ansätzen, selektive MDMX-Antagonisten zu entwickeln (Boltjes *et al.*, 2014), beschrieben kürzlich Soares *et al.* ein Molekül, DIMP53-1, welches MDM2 und MDMX gleichzeitig blockieren soll (Soares *et al.*, 2017). Zuvor publizierten Wade *et al.* den MDM2/MDMX-Antagonisten RO-5963 aus der Gruppe der Indolyl-Hydantoine (Graves *et al.*, 2012).

5.5 Ausblick

Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit sollten weitere Versuche mit YH239-EE (+) und Derivaten unternommen werden. Die Hypothese der Vorteilsstellung durch eine Ethylester-Gruppe führte bereits zur Entwicklung neuer Moleküle und der Untersuchung ihrer biologischen Aktivität bis hin zum Maus-Modell. Mit dem wachsenden Kenntniserwerb über die Struktur der Interaktionsfläche zwischen p53 und MDM2 muss die Funktion der Antagonisten schrittweise optimiert werden. Neochoritis *et al.* gelang es kürzlich sogar, einen Antagonisten zu konstruieren, der Konformationsänderungen von MDM2 berücksichtigt (Estrada-Ortiz, Neochoritis, & Domling, 2016; Neochoritis *et al.*, 2019; Neochoritis *et al.*, 2015). Doch obwohl im Zeitalter der vollständigen Genomsequenzierung täglich neue Mutationen und damit mögliche Angriffspunkte entdeckt werden, bleibt die Entwicklung neuer „small molecules“ sehr zeitaufwendig und teuer.

YH239-EE (+) könnte währenddessen auf weiteren AML-Blasten unterschiedlicher Charakteristika getestet werden. Darüberhinaus muss ein Versuch am Mausmodell erfolgen, um der klinischen Studie näher zu kommen und sich von den bisher entwickelten MDM2-Antagonisten abzuheben. Sollte sich YH239-EE (+) als ungeeignet für eine Monotherapie erweisen, könnten sich Versuche in Kombination mit VPA, Sorafinib oder einem MDMX-Antagonisten anschließen.

6 Abstract

Activation of p53 via inhibition of the p53-MDM2 interaction is a promising approach to non-genotoxic cancer treatment. It is a potential therapeutic strategy using p53-Mdm2 antagonist for the treatment of acute myeloid leukemia (Hamlin *et al.*) due to the occurrence of wild type p53 in the majority of patients. There is an emerging need to develop novel chemotypes of p53-MDM2 antagonists as the next generation anticancer agent. Herein we report an integrative approach for the design, synthesis and optimization of p53-MDM2 antagonists, resulting in the discovery of YH239-EE (ethyl ester of the lead compound YH239), a potent p53-MDM2 antagonizing and apoptosis inducing agent characterized by a number of leukemia cell lines as well as patient derived AML blast samples. The structural basis of the interaction between MDM2 (the p53 receptor) and YH239 is elucidated by a co-crystal structure. YH239-EE may act as a prodrug and is the most potent compound which induces apoptosis in AML cells and patient samples. The observed superior activity provides the preclinical basis for further investigation and progression of YH239-EE, which represents a novel class of anticancer agents potentially useful for the treatment of AML.

7 Publikationen

7.1 Hauptpublikation

Huang Y, Wolf S, Beck B, **Köhler LM**, Khoury K, Popowicz GM, Goda SK, Subklewe M, Twarda A, Holak TA, Dömling A. Discovery of highly potent p53-MDM2 antagonists and structural basis for anti-acute myeloid leukemia activities. *ACS Chem Biol*. 2014 Mar 21;9(3):802-11.

7.2 Weitere Publikationen

Neochoritis, C. G., Atmaj, J., Twarda-Clapa, A., Surmiak, E., Skalniak, L., **Köhler, L. M.**, et al. (2019). Hitting on the move: Targeting intrinsically disordered protein states of the MDM2-p53 interaction. *Eur J Med Chem*, 182, 111588.

8 Anhang

8.1 Weitere Daten

Name	#	R	Annexin-V + PI-positiv [%]	Caspase 3/7 Aktivität [% der Kontrolle]	Anteil in subG1 [%]	Metabol. Aktivität [%]
Zeit [h]			72	24	24	48
Säure-Basen-Paare						
YH325 A	6	E	97,6	60,8		89,9
YH325 B	7	E	61,6			
YH336	8	S	19,5			
YH309 A	9	E	77,2			
YH309 B	10	E	91,4	-14,1		56,4
YH314	11	S	16,5			
Weitere Verbindungen						
YH263	12	E (Vorstufe von YH265)	83,2	159,0		
YH264	13	S (Vorstufe von YH265)	55,0			
YH265	14	E (neues Amid)	M 96,0 **	20,0		
WW515	15	E (Vorstufe von WW536)	95,3			
WW536	16	E (neues Amid)	M 95,8 *	103,4		
KK342	17	E (Vorstufe von KK281)	M 29,5 *			
KK281	18	E (Vorstufe von KK_NW16)	M 30,4 *			
KK_NW 16	19	E	M 51,3 *	193,8		17,7
KK242	20	E (Derivat von KK_NW16)	M 44,2 *		M 24,3***	47,9
KK431	21	E (Derivat von KK_NW16)	M 41,7 *			
KK464	22	E (Derivat von KK_NW16)	M 10,4 *			
KK465	23	E (Derivat von KK_NW16)	M 43,2 *		M 35,3***	7,3
KK467	24	E (Derivat von KK_NW16)	M 28,1 *			
KKG001	25	E (Derivat von KK_NW16)	M 14,8 *			
KKG002	26	E (Derivat von KK_NW16)	8,4			

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse ergänzender Untersuchungen mit weiteren MDM2-Antagonisten.

Aufgeführt sind die Analysen zwei weiterer Säure-Basen-Paare sowie 15 weiterer Moleküle bzw. ihrer Derivate. Die Methoden waren die Induktion der Apoptose, die Messung der Caspase 3/7 – Aktivität, die Analyse der metabolischen Aktivität, sowie des Zellzyklus, und sind in Zeile 1 aufgeführt. Untersucht wurden die Substanzen in einer Konzentration von 20 μ M. Als Zelllinie diente MOLM-13. # = fortlaufende Nummerierung der MDM2-Antagonisten ergänzend zu Tabelle 1; R = Rest; E = Ester; S = Säure; n = Anzahl der Versuche wobei * n = 2, ** n = 3, *** n = 4.

8.2 Literaturverzeichnis

- Abramowitz, J., Neuman, T., Perlman, R., & Ben-Yehuda, D. (2017). Gene and protein analysis reveals that p53 pathway is functionally inactivated in cytogenetically normal Acute Myeloid Leukemia and Acute Promyelocytic Leukemia. *BMC Med Genomics*, 10(1), 18. doi:10.1186/s12920-017-0249-2
- Andreeff, M., Kelly, K. R., Yee, K., Assouline, S., Strair, R., Popplewell, L., et al. (2012). Results of the Phase 1 Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist, in Acute Leukemia. *ASH Annual Meeting Abstracts*, 120(21), 675-.
- Andreeff, M., Kelly, K. R., Yee, K., Assouline, S., Strair, R., Popplewell, L., et al. (2016). Results of the Phase I Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist in Leukemia. *Clin Cancer Res*, 22(4), 868-876. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0481
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., & Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *Embo j*, 12(2), 461-468.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., et al. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, 33(4), 451-458.
- Beryozkina, A., G. L. Nichols, Reckner, M., Vassilev, L. T., Rueger, R., Jukofsky, L., et al. (2011). *Pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of RG7112, an oral murine double minute 2 (MDM2) antagonist, in patients with leukemias and solid tumors*. ASCO Annual Meeting Abstracts 2011.
- Boatright, K. M., & Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 15(6), 725-731.
- Boltjes, A., Huang, Y., van de Velde, R., Rijkee, L., Wolf, S., Gaugler, J., et al. (2014). Fragment-based library generation for the discovery of a peptidomimetic p53-Mdm4 inhibitor. *ACS Comb Sci*, 16(8), 393-396. doi:10.1021/co500026b
- Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M., & Nigg, E. A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*, 56(3), 379-390.
- Bottger, A., Bottger, V., Garcia-Echeverria, C., Chene, P., Hochkeppel, H. K., Sampson, W., et al. (1997). Molecular characterization of the hdm2-p53 interaction. *J Mol Biol*, 269(5), 744-756. doi:10.1006/jmbi.1997.1078
- Bottger, V., Bottger, A., Howard, S. F., Picksley, S. M., Chene, P., Garcia-Echeverria, C., et al. (1996). Identification of novel mdm2 binding peptides by phage display. *Oncogene*, 13(10), 2141-2147.
- Braess, J., Schneider, F., Buske, C., Spiekermann, D., Adorf, D., Christ, O., et al. (2009). Akute myeloische Leukämie. In T. M. a. d. L.-M.-U. u. d. T. Universität (Ed.), *Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome* (pp. 19-70). Kornwestheim: W. Zuckerschwerdt.

- Bueso-Ramos, C. E., Yang, Y., deLeon, E., McCown, P., Stass, S. A., & Albitar, M. (1993). The human MDM-2 oncogene is overexpressed in leukemias. *Blood*, 82(9), 2617-2623.
- Burnett, A., Wetzler, M., & Lowenberg, B. (2011). Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 29(5), 487-494. doi:10.1200/jco.2010.30.1820
- Carr, A. M. (2000). Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle. *Science*, 287(5459), 1765-1766.
- Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1999). 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, 401(6753), 616-620. doi:10.1038/44188
- Chen, J., Marechal, V., & Levine, A. J. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol*, 13(7), 4107-4114.
- Chen, L., Agrawal, S., Zhou, W., Zhang, R., & Chen, J. (1998). Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(1), 195-200.
- Chen, X., Xie, H., Wood, B. L., Walter, R. B., Pagel, J. M., Becker, P. S., et al. (2015). Relation of clinical response and minimal residual disease and their prognostic impact on outcome in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 33(11), 1258-1264. doi:10.1200/jco.2014.58.3518
- Christner, S. M., Clausen, D. M., Beumer, J. H., Parise, R. A., Guo, J., Huang, Y., et al. (2015). In vitro cytotoxicity and in vivo efficacy, pharmacokinetics, and metabolism of pyrazole-based small molecule inhibitors of Mdm2/4-p53 interaction. *Cancer Chemother Pharmacol*, 76(2), 287-299. doi:10.1007/s00280-015-2791-y
- Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo j*, 17(24), 7151-7160. doi:10.1093/emboj/17.24.7151
- Cuda, C. M., Pope, R. M., & Perlman, H. (2016). The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 12(9), 543-558. doi:10.1038/nrrheum.2016.132
- Czarna, A., Beck, B., Srivastava, S., Popowicz, G. M., Wolf, S., Huang, Y., et al. (2010). Robust generation of lead compounds for protein-protein interactions by computational and MCR chemistry: p53/Hdm2 antagonists. *Angew Chem Int Ed Engl*, 49(31), 5352-5356. doi:10.1002/anie.201001343
- de Graaf, P., Little, N. A., Ramos, Y. F., Meulmeester, E., Letteboer, S. J., & Jochemsen, A. G. (2003). Hdmx protein stability is regulated by the ubiquitin ligase activity of Mdm2. *J Biol Chem*, 278(40), 38315-38324. doi:10.1074/jbc.M213034200
- de Stanchina, E., McCurrach, M. E., Zindy, F., Shieh, S. Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A. V., et al. (1998). E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev*, 12(15), 2434-2442.

- Ding, K., Lu, Y., Nikolovska-Coleska, Z., Wang, G., Qiu, S., Shangary, S., et al. (2006). Structure-based design of spiro-oxindoles as potent, specific small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 interaction. *J Med Chem*, 49(12), 3432-3435. doi:10.1021/jm051122a
- Dohner, K., Schlenk, R. F., Habdank, M., Scholl, C., Rucker, F. G., Corbacioglu, A., et al. (2005). Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*, 106(12), 3740-3746. doi:10.1182/blood-2005-05-2164
- Duncan, S. J., Gruschow, S., Williams, D. H., McNicholas, C., Purewal, R., Hajek, M., et al. (2001). Isolation and structure elucidation of Chlorofusin, a novel p53-MDM2 antagonist from a *Fusarium* sp. *J Am Chem Soc*, 123(4), 554-560.
- el-Deiry, W. S. (1998). Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol*, 8(5), 345-357.
- Estrada-Ortiz, N., Neochoritis, C. G., & Domling, A. (2016). How To Design a Successful p53-MDM2/X Interaction Inhibitor: A Thorough Overview Based on Crystal Structures. *ChemMedChem*, 11(8), 757-772. doi:10.1002/cmdc.201500487
- Fakharzadeh, S. S., Rosenblum-Vos, L., Murphy, M., Hoffman, E. K., & George, D. L. (1993). Structure and organization of amplified DNA on double minutes containing the mdm2 oncogene. *Genomics*, 15(2), 283-290. doi:10.1006/geno.1993.1058
- Fakharzadeh, S. S., Trusko, S. P., & George, D. L. (1991). Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *Embo j*, 10(6), 1565-1569.
- Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., et al. (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*, 352(3), 254-266. doi:10.1056/NEJMoa041974
- Fenaux, P., Jonveaux, P., Quiquandon, I., Lai, J. L., Pignon, J. M., Loucheux-Lefebvre, M. H., et al. (1991). P53 gene mutations in acute myeloid leukemia with 17p monosomy. *Blood*, 78(7), 1652-1657.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., & Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 57(7), 1083-1093.
- Flotho, A., & Melchior, F. (2013). Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu Rev Biochem*, 82, 357-385. doi:10.1146/annurev-biochem-061909-093311
- Freedman, D. A., Epstein, C. B., Roth, J. C., & Levine, A. J. (1997). A genetic approach to mapping the p53 binding site in the MDM2 protein. *Mol Med*, 3(4), 248-259.
- Gartel, A. L. (2006). Is p21 an oncogene? *Mol Cancer Ther*, 5(6), 1385-1386. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0163

- Graves, B., Thompson, T., Xia, M., Janson, C., Lukacs, C., Deo, D., et al. (2012). Activation of the p53 pathway by small-molecule-induced MDM2 and MDMX dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(29), 11788-11793. doi:10.1073/pnas.1203789109
- Hamlin, J. L., Milbrandt, J. D., Heintz, N. H., & Azizkhan, J. C. (1984). DNA sequence amplification in mammalian cells. *Int Rev Cytol*, 90, 31-82.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., & Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630), 296-299. doi:10.1038/387296a0
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, 253(5015), 49-53.
- Honda, R., Tanaka, H., & Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*, 420(1), 25-27.
- Honda, R., & Yasuda, H. (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo j*, 18(1), 22-27. doi:10.1093/emboj/18.1.22
- Howlader N, N. A., Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. (2019). *SEER Cancer Statistics Review 1975-2016*. National Cancer Institute. Retrieved from https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/
- Hu, G., Zhang, W., & Deisseroth, A. B. (1992). P53 gene mutations in acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*, 81(4), 489-494.
- Huang, Y., Wolf, S., Beck, B., Kohler, L. M., Khoury, K., Popowicz, G. M., et al. (2014). Discovery of highly potent p53-MDM2 antagonists and structural basis for anti-acute myeloid leukemia activities. *ACS Chem Biol*, 9(3), 802-811. doi:10.1021/cb400728e
- Hunter, A. M., & Sallman, D. A. (2019). Current status and new treatment approaches in TP53 mutated AML. *Best Pract Res Clin Haematol*, 32(2), 134-144. doi:10.1016/j.beha.2019.05.004
- Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., et al. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 71(4), 587-597.
- Khoury, K., Popowicz, G. M., Holak, T. A., & Domling, A. (2011). The p53-MDM2/MDMX axis - A chemotype perspective. *Medchemcomm*, 2, 246-260. doi:10.1039/C0MD00248H
- Kiyoi, H., Towatari, M., Yokota, S., Hamaguchi, M., Ohno, R., Saito, H., et al. (1998). Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia*, 12(9), 1333-1337.

- Kojima, K., Konopleva, M., Samudio, I. J., Shikami, M., Cabreira-Hansen, M., McQueen, T., et al. (2005). MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood*, 106(9), 3150-3159. doi:10.1182/blood-2005-02-0553
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., & van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84(5), 1415-1420.
- Kottaridis, P. D., Gale, R. E., Frew, M. E., Harrison, G., Langabeer, S. E., Belton, A. A., et al. (2001). The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*, 98(6), 1752-1759.
- Krug, U., Buchner, T., Berdel, W. E., & Muller-Tidow, C. (2011). The treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia. *Dtsch Arztebl Int*, 108(51-52), 863-870. doi:10.3238/arztebl.2011.0863
- Kubbutat, M. H., Ludwig, R. L., Levine, A. J., & Vousden, K. H. (1999). Analysis of the degradation function of Mdm2. *Cell Growth Differ*, 10(2), 87-92.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., et al. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16), 9112-9117.
- Kussie, P. H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A. J., et al. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, 274(5289), 948-953.
- Lane, D. P., & Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278(5701), 261-263.
- Levine, A. J., Momand, J., & Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 351(6326), 453-456. doi:10.1038/351453a0
- Lindstrom, M. S., Jin, A., Deisenroth, C., White Wolf, G., & Zhang, Y. (2007). Cancer-associated mutations in the MDM2 zinc finger domain disrupt ribosomal protein interaction and attenuate MDM2-induced p53 degradation. *Mol Cell Biol*, 27(3), 1056-1068. doi:10.1128/mcb.01307-06
- Longo, D. L., 1949-; Harrison, Tinsley Randolph, 1990-1978. (2010). *Harrison's Hematology and Oncology* (D. L. Longo Ed.). New York: McGraw-Hill Medical.
- Marine, J. C., Dyer, M. A., & Jochemsen, A. G. (2007). MDMX: from bench to bedside. *J Cell Sci*, 120(Pt 3), 371-378. doi:10.1242/jcs.03362
- McCormack, E., Haaland, I., Venas, G., Forthun, R. B., Huseby, S., Gausdal, G., et al. (2012). Synergistic induction of p53 mediated apoptosis by valproic acid and

- nutlin-3 in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 26(5), 910-917.
doi:10.1038/leu.2011.315
- Meek, D. W. (1999). Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene*, 18(53), 7666-7675. doi:10.1038/sj.onc.1202951
- Meireles, L. M., Domling, A. S., & Camacho, C. J. (2010). ANCHOR: a web server and database for analysis of protein-protein interaction binding pockets for drug discovery. *Nucleic Acids Res*, 38(Web Server issue), W407-411.
doi:10.1093/nar/gkq502
- Moll, U. M., & Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res*, 1(14), 1001-1008.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., & Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69(7), 1237-1245.
- Mularski, J., Malarz, K., Pacholczyk, M., & Musiol, R. (2019). The p53 stabilizing agent CP-31398 and multi-kinase inhibitors. Designing, synthesizing and screening of styrylquinazoline series. *Eur J Med Chem*, 163, 610-625.
doi:10.1016/j.ejmech.2018.12.012
- Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T., Kaneko, H., Horiike, S., Kashima, K., et al. (1996). Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 10(12), 1911-1918.
- Neochoritis, C. G., Atmaj, J., Twarda-Clapa, A., Surmiak, E., Skalniak, L., Kohler, L. M., et al. (2019). Hitting on the move: Targeting intrinsically disordered protein states of the MDM2-p53 interaction. *Eur J Med Chem*, 182, 111588.
doi:10.1016/j.ejmech.2019.111588
- Neochoritis, C. G., Wang, K., Estrada-Ortiz, N., Herdtweck, E., Kubica, K., Twarda, A., et al. (2015). 2,30-Bis(10H-indole) heterocycles: New p53/MDM2/MDMX antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*, 25(24), 5661-5666.
doi:10.1016/j.bmcl.2015.11.019
- Ohki, R., Nemoto, J., Murasawa, H., Oda, E., Inazawa, J., Tanaka, N., et al. (2000). Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem*, 275(30), 22627-22630. doi:10.1074/jbc.C000235200
- Oliner, J. D., Saiki, A. Y., & Caenepel, S. (2016). The Role of MDM2 Amplification and Overexpression in Tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(6).
doi:10.1101/cshperspect.a026336
- Parada, L. F., Land, H., Weinberg, R. A., Wolf, D., & Rotter, V. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature*, 312(5995), 649-651.
- Prokocimer, M., Molchadsky, A., & Rotter, V. (2017). Dysfunctional diversity of p53 proteins in adult acute myeloid leukemia: projections on diagnostic workup and therapy. *Blood*, 130(6), 699-712. doi:10.1182/blood-2017-02-763086

- Reed, J. C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*, 17(9), 2941-2953.
- Robert-Koch-Institut. (2017, 06.12.2017). Zentrum für Krebsregisterdaten. Retrieved from http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leukaemien/leukaemien_node.html
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P., & Hay, R. T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo j*, 18(22), 6455-6461. doi:10.1093/emboj/18.22.6455
- Roth, J., Dobbelstein, M., Freedman, D. A., Shenk, T., & Levine, A. J. (1998). Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *Embo j*, 17(2), 554-564. doi:10.1093/emboj/17.2.554
- Sakaguchi, K., Saito, S., Higashimoto, Y., Roy, S., Anderson, C. W., & Appella, E. (2000). Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J Biol Chem*, 275(13), 9278-9283.
- Schnerch, D., Yalcintepe, J., Schmidts, A., Becker, H., Follo, M., Engelhardt, M., et al. (2012). Cell cycle control in acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res*, 2(5), 508-528.
- Schon, O., Friedler, A., Bycroft, M., Freund, S. M., & Fersht, A. R. (2002). Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *J Mol Biol*, 323(3), 491-501.
- Shvarts, A., Steegenga, W. T., Riteco, N., van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M., et al. (1996). MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *Embo j*, 15(19), 5349-5357.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1), 76-85.
- Soares, J., Espadinha, M., Raimundo, L., Ramos, H., Gomes, A. S., Gomes, S., et al. (2017). DIMP53-1: A novel small-molecule dual inhibitor of p53-MDM2/X interactions with multifunctional p53-dependent anticancer properties. *Mol Oncol*. doi:10.1002/1878-0261.12051
- Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T., et al. (1994). p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*, 78(4), 703-711.
- Thomas, E., Gopalakrishnan, V., Somasagara, R. R., Choudhary, B., & Raghavan, S. C. (2016). Extract of *Vernonia condensata*, Inhibits Tumor Progression and Improves Survival of Tumor-allograft Bearing Mouse. *Sci Rep*, 6, 23255. doi:10.1038/srep23255

- Tovar, C., Graves, B., Packman, K., Filipovic, Z., Higgins, B., Xia, M., et al. (2013). MDM2 small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumors in preclinical cancer models. *Cancer Res*, 73(8), 2587-2597. doi:10.1158/0008-5472.can-12-2807
- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), 937-951. doi:10.1182/blood-2009-03-209262
- Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., et al. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 303(5659), 844-848. doi:10.1126/science.1092472
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39-51. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-1](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-1)
- Vogelstein, B. (1990). Cancer. A deadly inheritance. *Nature*, 348(6303), 681-682. doi:10.1038/348681a0
- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), 307-310. doi:10.1038/35042675
- Wade, M., Wang, Y. V., & Wahl, G. M. (2010). The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol*, 20(5), 299-309. doi:10.1016/j.tcb.2010.01.009
- Wade, M., Wong, E. T., Tang, M., Stommel, J. M., & Wahl, G. M. (2006). Hdmx modulates the outcome of p53 activation in human tumor cells. *J Biol Chem*, 281(44), 33036-33044. doi:10.1074/jbc.M605405200
- Wahl, G. M., Linke, S. P., Paulson, T. G., & Huang, L. C. (1997). Maintaining genetic stability through TP53 mediated checkpoint control. *Cancer Surv*, 29, 183-219.
- Wang, W., Takimoto, R., Rastinejad, F., & El-Deiry, W. S. (2003). Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorylation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. *Mol Cell Biol*, 23(6), 2171-2181.
- Wattel, E., Preudhomme, C., Hecquet, B., Vanrumbeke, M., Quesnel, B., Dervite, I., et al. (1994). p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*, 84(9), 3148-3157.
- Zauli, G., Celeghini, C., Melloni, E., Voltan, R., Ongari, M., Tiribelli, M., et al. (2012). The sorafenib plus nutlin-3 combination promotes synergistic cytotoxicity in acute myeloid leukemic cells irrespectively of FLT3 and p53 status. *Haematologica*, 97(11), 1722-1730. doi:10.3324/haematol.2012.062083
- Zhang, Y., & Xiong, Y. (2001). Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. *Cell Growth Differ*, 12(4), 175-186.

Zhou, J., & Prives, C. (2003). Replication of damaged DNA in vitro is blocked by p53.
Nucleic Acids Res, 31(14), 3881-3892. doi:10.1093/nar/gkg468

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aktivierung von p53	6
Abbildung 2	Ubiquitinierung von p53 durch MDM2	8
Abbildung 3	Interaktionsfläche von p53 und MDM2	9
Abbildung 4	Induktion der Apoptose durch die MDM2-Antagonisten Nutlin-3a und b	11
Abbildung 5	Substrate der Multikomponentenreaktion	13
Abbildung 6	Grundgerüst der neuen p53-MDM2-Antagonisten	13
Abbildung 7	Färbung von Zellen mit FITC Annexin V und PI	27
Abbildung 8	Darstellung der Zellzyklusphasen	29
Abbildung 9	Zusammenspiel von extrinsischem (links) und intrinsischem (rechts) Signalweg der Apoptose mit kaskadenartiger Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7	31
Abbildung 10	Zelllinien-spezifische Hemmung des Zellwachstums durch Nutlin-3a	36
Abbildung 11	Messung der SubG ₁ -Population 24 h nach Behandlung mit Nutlin-3a	37
Abbildung 12	Messung der metabolischen Aktivität/Proliferation mit dem WST-1 Reagenz	38
Abbildung 13	Induktion von Apoptose und Nekrose durch Nutlin-3a	39
Abbildung 14	Analyse der neuen Antagonisten durch Annexin V/PI- Färbung	42
Abbildung 15	Zellzyklusanalyse von MOLM-13-Zellen nach Behandlung mit neuen potentiellen MDM2-Antagonisten	44
Abbildung 16	Induktion von Apoptose/Nekrose durch YH239-EE oder YH239	45
Abbildung 17	Bestimmung der SubG ₁ -Zellen nach Behandlung mit YH239- EE und YH239 über 24 h	47
Abbildung 18	Konzentrationsabhängige Änderung der metabolischen Aktivität nach Inkubation mit YH239-EE	48
Abbildung 19	Aktivitätsmessung der Caspasen 3 und 7	50
Abbildung 20	Struktur (asymmetrisches C-Atom) und Stereozentrum von YH239-EE	51

Abbildung 21	Apoptoseinduktion durch die Enantiomere YH239-EE (-) und YH239-EE (+)	52
Abbildung 22	Vergleich der Wirksamkeit von YH239-EE (-) und YH239-EE (+) auf Zellproliferation und -metabolismus	53
Abbildung 23	Induktion von Effektorcaspasen durch YH239-EE (+)	54
Abbildung 24	P21-Detektion im Western Blot	55
Abbildung 25	Apoptoseinduktion durch YH239-EE (+) in primären Blasten aus 8 AML-Patienten	57
Abbildung 26	Annexin /PI-Färbung von Patientenprobe #4 nach 72 h	58

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Neue MDM2-Antagonisten	14
Tabelle 2	In der vorliegenden Arbeit verwendete Zelllinien mit <i>TP53</i> -Status	22
Tabelle 3	Verdünnung von MDM2-Antagonisten	25
Tabelle 4	Formel für die Herstellung der Sammel- und Trenngele	32
Tabelle 5	Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Behandlung von 4 AML-Zelllinien mit neuen potentiellen MDM2-Antagonisten	43
Tabelle 6	Bestimmung der SubG ₁ -Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie	44
Tabelle 7	Zyto- und molekulargenetische Charakteristika der primären Blasten aus AML-Patienten	56
Tabelle 8	Zusammenfassung der Ergebnisse ergänzender Untersuchungen mit weiteren MDM2-Antagonisten	67

8.5 Abkürzungen

AIDA	Antagonist induced dissociation assay
AML	Akute myeloische Leukämie
APL	Akute promyelozytische Leukämie
APS	Ammonium Persulfat
ATM	Ataxia telangiectasia mutated Kinase
ATR	ataxia telangiectasia related
AUC	Area under the curve
AUT	Österreich
BM	Bone marrow
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovine serum albumin
CDK	Cyclin-dependent kinase
CHE	Schweiz
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
C-terminal	Carboxy-terminal
DISC	Death-Inducing Signalling Complex
DLT	Dosislimitierende Toxizität
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNK	Dänemark
DNA-PK	DNS-abhängigen Proteinkinase
D	Deutschland
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
FAB	French-American-British
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
	Forward Scatter
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FIN	Finnland
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
FRA	Frankreich
GADD45	Growth arrest and DNA damage
ITD	Internal tandem duplication

K _D	Bindungskonstante
Leu	Leucin
LOQ	Linker oberer Quadrant
LUQ	Linker unterer Quadrant
M	Molar
MCR	Multikomponentenreaktion
MDM2	murine double minute 2
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MRD	Minimal rest disease
MTD	Maximal tolerierbare Dosis
NES	nuclear export signal
NPM	Nucleophosmin
N-terminal	Amino-terminal
NZL	New Zealand
PB	Peripheres Blut
PBMC	Periphal Blood Mononuclear Cell
Phe	Phenylalanin
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
rcf	Relative centrifugal force
ROQ	Rechter oberer Quadrant
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RUQ	Rechter unterer Quadrant
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SFC	Superkritische Fluid Chromatographie
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
SSC	Side Scatter
SV 40	Simian-Virus 40
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Thr	Threonin
TPO	Thrombopoetin
Trp	Tryptophan
Ub	Ubiquitin

VPA

WHO





wt

Valproinsäure

World Health Organisation

Wildtyp

8.6 Ethikvotum

			
---	---	--	---

Klinikum der Universität München - Ethikkommission - Marchioninistr. 15 - 81337 München

Frau
PD Dr. M. Subklewe
Med. Klinik III
Klinikum Großhadern
- im Hause -

Vorsitzender:
Prof. Dr. G. Paumgartner
Telefon: +49 89 3095-4609
Telefax: +49 89 3095-7809
ethikkommission@med.uni-muenchen.de

www.med.uni-muenchen.de/ethikkommission

Postanschrift:
Marchioninstr. 15
D-81337 München

München, 17.11.2008 HH/cp

Titel:	In-vitro- Studien zur Etablierung neuer Immuntherapien bei akuter myeloischer Leukämie (AML) und anderen hämatologischen Neoplasien
Antragsteller:	PD Dr. M. Subklewe
Projekt- Nr.	216-08

Sehr geehrte Frau Kollegin Subklewe,

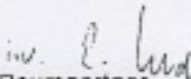
besten Dank für Ihr Schreiben vom 17.11.2008 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen (Patienten- und Probandeninformation, Einwilligungserklärung).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Sie werden gebeten, die EK über alle schwerwiegenden oder unerwarteten Ereignisse im Rahmen der Studie zu unterrichten.
Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen.

Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.
Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. G. Paumgartner
Vorsitzender der Ethikkommission

N/ Mitglieder der Ethikkommission

P.S.: Bitte beachten Sie die aktuellen Richtlinien /Erläuterungen zum Antragsformular:
<http://ethikkommission.web.med.uni-muenchen.de>

Mitglieder der Kommission:
Prof. Dr. G. Paumgartner (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Heitsch (Vize), Prof. Dr. H. U. Gellert, Prof. Dr. D. Kurze,
Dr. V. Mönch, Prof. Dr. V. Kötter, Prof. Dr. H. Pöschel, Prof. Dr. K. Nahr, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. G. Zech

8.7 Danksagungen

Ich danke meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Marion Subklewe für ihren Mut, mich an diesem Projekt arbeiten zu lassen, ihre Inspiration und die hervorragenden Rahmenbedingungen, unter denen ich meine Doktorarbeit leisten durfte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Barbara Beck, die mich weit über die Grenzen des Notwendigen unterstützt hat. Ihre Kompetenz und ihr Rückhalt waren die Eckpfeiler meiner Arbeit. Ich bin sehr dankbar, dass darüber hinaus ein so freundschaftliches Verhältnis entstanden ist.

Ohne meine Eltern und ihre bedingungslose Unterstützung in jeglicher Hinsicht hätte diese Arbeit erst gar nicht entstehen können. Ihr seid der Grund dafür, dass ich mein Studium und meine Doktorarbeit ohne Sorgen und ohne Druck absolvieren konnte. Euer Rat, Euer Ansporn und Eure Umarmungen haben mir sehr geholfen.

Bruderherz, Du hast mich mit einer Masterarbeit überholt und mich sehr beeindruckt.

Ich danke Dir, Christoph, für deine zu beneidende technische Kompetenz, die mir den letzten Feinschliff leicht gemacht hat.

Schließlich danke ich meinen Freunden in Sigmaringen und München, die mich immer wieder abgelenkt haben, im positiven Sinne.